



PCT

特許協約に基づいて公開された国際願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 1/21, 1/32, 9/00, 15/52, C12P 13/04</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/61723</p> <p>(43) 国際公開日 2000年10月19日(19.10.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02295</p> <p>(22) 国際出願日 2000年4月7日(07.04.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/103143 1999年4月9日(09.04.99) JP 特願平11/169447 1999年6月16日(16.06.99) JP 特願平11/368097 1999年12月24日(24.12.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)(JP/JP) 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 郡司義哉(GUNJI, Yoshiya)(JP/JP) 安枝 寿(YASUEDA, Hisashi)(JP/JP) 杉本慎一(SUGIMOTO, Shinichi)(JP/JP) 辻本信晴(TSUJIMOTO, Nobuharu)(JP/JP) 島岡 恵(SHIMAOKA, Megumi)(JP/JP) 宮田由理(MIYATA, Yuri)(JP/JP) 大場麻奈美(OBA, Manami)(JP/JP) 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 発酵技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, JP, KR, MX, PL, RU, SK, US, VN, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: L-AMINO ACID-PRODUCING BACTERIA AND PROCESS FOR PRODUCING L-AMINO ACID</p> <p>(54)発明の名称 L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法</p> <p>(57) Abstract An L-amino acid is produced by culturing, in a medium containing methanol as the main carbon source, a bacterium belonging to the genus <i>Methylophilus</i>, being capable of growing with the use of methanol as the main carbon source, and having an L-amino acid productivity (for example, a bacterium belonging to the genus <i>Methylophilus</i> having been transformed by introducing a DNA encoding dihydrodipicolinate synthase free from the feedback inhibition by L-lysine and another DNA encoding aspartokinase free from the feedback inhibition by L-lysine into the cell and thus having enhanced dihydrodipicolinate synthase activity and aspartokinase activity), or a bacterium belonging to the genus <i>Methylophilus</i> and having a casamino acid requirement.</p>		

メタノールを主たる炭素源として生育することができ、かつ、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌、例えば、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強されたメチロフィラス属細菌、又はカザミノ酸要求性となったメチロフィラス属細菌を、メタノールを主たる炭素源とする培地に培養し、L-アミノ酸を製造する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BH	ブルハナ・ファソ	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
		KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

技術分野

本発明は微生物工業に関連したものであり、詳しくは、発酵法によるL-アミノ酸の製造法、及び同製造法に用いる微生物に関するものである。

背景技術

L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリン及びL-フェニルアラニン等のアミノ酸は、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属、ストレプトミセス属、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、ペニシリウム属、キャンディダ属等に属する微生物を用いた発酵法により工業生産されている。これらの微生物としては、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。また、組換えDNA技術によりL-グルタミン酸の生合成酵素の活性を増強することによって、L-グルタミン酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。

上記のような微生物の育種や製造法の改良により、L-アミノ酸の生産性はかなり高まってはいるが、今後の需要の一層の増大に応えるためには、さらに安価かつ効率的なL-アミノ酸の製造法の開発が求められている。

ところで、従来、安価に大量に入手可能な発酵原料であるメタノールから発酵法によりアミノ酸を製造する方法としては、アクロモバクター属およびシュードモナス属（特公昭45-25273号公報）、プロタミノバクター属（特開昭49-125590号公報）、プロタミノバクター属及びメタノモナス属（特開昭50-25790号公報）、ミクロサイクラス属（特開昭52-18886号公報）、メチロバチルス属（特開平4-91793号公報）、バチルス属（特開平3-505284号公報）などに属する微生物を用いる方法が知られている。

しかし、これまでメチロフィラス属細菌を用いてL-アミノ酸を製造することは知られていない。また、組換えDNAを用いたメチロフィラス属細菌の形質転

換方法として、EP 0 035 831 A、EP 0 037 273 A、EP 0 066 994 Aに記載の方法が知られているが、メチロフィラス属細菌のアミノ酸の生産性の改善に組換えDNA技術が適用された例は知られていない。

発明の開示

本発明は、新規なL-アミノ酸生産菌及び同生産菌を用いたL-アミノ酸の製造法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、メチロフィラス属細菌がL-アミノ酸の製造に適していることを見出した。さらに、従来、メチロフィラス属細菌の栄養要求性変異株を得ることは困難であるとされてきた(FEMS Microbiology Rev. 39, 235-258 (1986)、Antonie van Leeuwenhoek 53, 47-53 (1987))が、本発明者らは同細菌の栄養要求性変異株を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

- (1) L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌。
- (2) L-アミノ酸がL-リジン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン又はL-スレオニンである(1)のメチロフィラス属細菌。
- (3) L-アミノ酸アナログ耐性又はL-アミノ酸要求性を有する(1)のメチロフィラス属細菌。
- (4) L-アミノ酸生合成系酵素の活性が増強された(1)のメチロフィラス属細菌。
- (5) ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強され、L-リジン生産能を有する(1)のメチロフィラス属細菌。
- (6) ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性が増強され、L-リジン生産能を有する(1)のメチロフィラス属細菌。
- (7) アスパルトキナーゼ活性が増強され、L-リジン生産能を有する(1)のメチロフィラス属細菌。
- (8) さらにアスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、及び、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素から選ばれる1種、2種又

は3種の酵素の活性が増強された(5)～(7)のいずれかのメチロフィラス属細菌。

(9) L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強された(5)のメチロフィラス属細菌。

(10) アスパルトキナーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、ホモセリンキナーゼ及びスレオニンシンターゼの活性が増強され、L-スレオニン生産能を有する(1)のメチロフィラス属細菌。

(11) メチロフィラス属細菌がメチロフィラス・メチロトロファスである(1)～(10)のいずれかの細菌。

(12) 前記(1)～(11)のいずれかに記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

(13) 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする(12)の方法。

(14) 前記(1)～(11)のいずれかに記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該細菌の菌体中にL-アミノ酸を生産蓄積させることを特徴とする、L-アミノ酸含量が増加したメチロフィラス属細菌菌体の製造法。

(15) L-アミノ酸がL-リジン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン又はL-スレオニンである(14)記載のメチロフィラス属細菌菌体の製造法。

(16) 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、アスパルトキナーゼ活性を有するタンパク質。

(17) 下記(a)又は(b)に示すDNAである(16)のDNA。

(a) 配列番号5の塩基番号510～1736からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号5の塩基番号510～1736からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アスパルトキナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(18) 下記(C)又は(D)に示すタンパク質をコードするDNA。

(C) 配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素活性を有するタンパク質。

(19) 下記(c)又は(d)に示すDNAである(18)のDNA。

(c) 配列番号7の塩基番号98～1207からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列番号7の塩基番号98～1207からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(20) 下記(E)又は(F)に示すタンパク質をコードするDNA。

(E) 配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性を有するタンパク質。

(21) 下記(e)又は(f)に示すDNAである(20)のDNA。

(e) 配列番号9の塩基番号1268～2155からなる塩基配列を含むDNA。

(f) 配列番号9の塩基番号1268～2155からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(22) 下記(G)又は(H)に示すタンパク質をコードするDNA。

(G) 配列番号12に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(H) 配列番号12に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジ

ヒドロジビコリン酸レダクターゼ活性を有するタンパク質。

(23) 下記 (g) 又は (h) に示すDNAである (22) のDNA。

(g) 配列番号11の塩基番号2080～2883からなる塩基配列を含むDNA。

(h) 配列番号11の塩基番号2080～2883からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジヒドロジビコリン酸レダクターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(24) 下記 (I) 又は (J) に示すタンパク質をコードするDNA。

(I) 配列番号14に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(J) 配列番号14に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

(25) 下記 (i) 又は (j) に示すDNAである (24) のDNA。

(i) 配列番号13の塩基番号751～1995からなる塩基配列を含むDNA。

(j) 配列番号13の塩基番号751～1995からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

尚、本明細書において「L-アミノ酸生産能」とは、本発明の微生物を培地に培養したときに、培地中に有意な量のL-アミノ酸を蓄積する能力、又は菌体中のアミノ酸含量を増加させる能力をいう。

図面の簡単な説明

図1は、変異型dapAを有するプラスミドRSF24Pの製造工程を示す図。「dapA*24」は、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された変異型DDPSをコード変異型dapAを表す。

図2は、変異型dapA及び変異型lysCを有するプラスミドRSFD80の製造工程を示す図。「lysC*80」は、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された変異型AKIIIをコード変異型lysCを表す。

図3は、ask遺伝子を保持するE. coli形質転換株のアスパルトキナーゼ活性を示す図。

図4は、asd遺伝子を保持するE. coli形質転換株のアスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素活性を示す図。

図5は、dapA遺伝子を保持するE. coli形質転換株のジヒドロジピコリン酸合成酵素活性を示す図。

図6は、dapB遺伝子を保持するE. coli形質転換株のジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性を示す図。

図7は、lysA遺伝子を保持するE. coli形質転換株のジアミノピメリン酸脱炭酸酵素活性を示す図。

発明を実施するための最良の形態

< 1 > 本発明の微生物

本発明の微生物は、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌である。本発明のメチロフィラス属細菌としては、例えばメチロフィラス・メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*) AS1株 (NCIMB10515) 等が挙げられる。メチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。

本発明により生産されるL-アミノ酸としては、L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシン等が挙げられる。生産されるアミノ酸は1種類でもよく、2種又は3種以上であってもよい。

L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌は、メチロフィラス属細菌の野生株にL-アミノ酸生産能を付与することにより取得され得る。L-アミノ酸生産能を付与するには、栄養要求性変異株、L-アミノ酸アナログ耐性株、又は代謝制御変異株の取得、L-アミノ酸生合成系酵素の活性が増強された組換え

株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる（アミノ酸発酵、（株）学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77～100頁参照）。アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、L-アミノ酸アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、その活性が増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、L-アミノ酸アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、L-アミノ酸生合成系酵素の活性の増強が組み合わされてもよい。

例えば、L-リジン生産菌は、L-ホモセリン、又はL-スレオニン及びL-メチオニンを要求する変異株（特公昭48-28078号、特公昭56-6499号）、イノシトールまたは酢酸を要求する変異株（特開昭55-9784号、特開昭56-8692号）、又はオキサリジン、リジンハイドロキサメート、S-(2-アミノエチル)-システイン、 γ -メチルリジン、 α -クロロカプロラクタム、DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタム、 α -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、又はN-ラウロイルロイシンに耐性を有する変異株として育種することができる。

また、L-グルタミン酸生産菌はオレイン酸要求変異株等として、L-スレオニン生産菌は α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸耐性変異株として、L-ホモセリン生産菌はL-スレオニン要求変異株又はL-フェニルアラニンアナログ耐性変異株として、L-フェニルアラニン生産菌は、L-チロシン要求変異株として、L-イソロイシン生産菌はL-ロイシン要求変異株として、L-プロリン生産菌は、L-イソロイシン要求変異株として、育種することができる。

さらに、後記実施例に示すように、分岐鎖アミノ酸（L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン）の1種又は2種以上を生産する菌株は、カザミノ酸要求株として取得され得る。

本発明者は、メチロフィラス属細菌から変異株を取得するために、まずストレプトマイシン耐性株の出現頻度を指標に最適な変異処理条件を詳細に検討した。その結果、変異処理後の生存率が約0.5%となる条件のとき、ストレプトマイシン耐性株の出現頻度が最高となり、この条件により栄養要求株を取得すること

に成功した。また、変異株のスクリーニングもこれまでE. coli等で行われているよりも大幅にスケールアップして行うことにより、困難とされてきた栄養要求株の取得に成功した。

上記のように、変異株取得に好適な条件でメチロフィラス属細菌を変異処理することにより変異株の取得が可能であることが判明したので、変異処理方法に応じて変異処理後の生存率が約0.5%となるような条件を適宜設定することにより、所望の変異株を取得することが容易となる。

メチロフィラス属細菌から変異株を得るための変異処理としては、紫外線照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。また、メチロフィラス属細菌の自然突然変異株を選択することによっても、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌を得ることができる。

L-アミノ酸アナログ耐性変異株は、例えば、変異処理したメチロフィラス属細菌を種々の濃度のL-アミノ酸アナログを含有する寒天培地に接種し、コロニーを形成する菌株を選択することにより、取得することができる。

また、栄養要求性変異株は、メチロフィラス属細菌のコロニーを目的の栄養物質（例えば、L-アミノ酸）を含む寒天培地に形成させ、これを前記栄養物質を含まない寒天培地にレプリカし、同栄養物質を含まない寒天培地で生育できない菌株を選択することにより、取得することができる。

次に、L-アミノ酸生合成系酵素の活性の増強によってL-アミノ酸生産能を付与又は増強する方法を、以下に例示する。

〔L-リジン〕

L-リジン生産能は、例えば、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及び／又はアスパルトキナーゼ活性を増強することによって付与することができる。

メチロフィラス属細菌のジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及び／又はアスパルトキナーゼ活性を増強するには、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子断片及び／又はアスパルトキナーゼをコードする遺伝子断片を、メチロフィラス属細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをメチロフィラス属細菌の宿主に導入して形質

転換すればよい。形質転換株の細胞内のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子及び／又はアスパルトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、これらの酵素の活性が増強される。以下、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をDDPS、アスパルトキナーゼをAK、アスパルトキナーゼIIIをAKIIIと略すことがある。

DDPSをコードする遺伝子及びAKをコードする遺伝子の供与微生物としては、メチロフィラス属に属する微生物中でDDPS活性及びAK活性を発現することができる微生物であれば、いかなる微生物でも使用できる。微生物は、野生株及びそれから誘導した変異株のいずれでもよい。具体的には*E. coli* (エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)) K-12株及びメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCI MB10515) 等が挙げられる。エシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードする遺伝子 (*dapA*, Richaud, F. et al. *J. Bacteriol.*, 297 (1986)) 及びAKIIIをコードする遺伝子 (*lysC*, Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G.N. and Patte, J.C., *J. Biol. Chem.*, 261, 1052(1986)) は、いずれも塩基配列が明らかにされているので、これらの遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、*E. coli* K-12等の微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法により、これらの遺伝子を取得することが可能である。以下、*E. coli*由来の*dapA*及び*lysC*を例として説明するが、本発明に用いる遺伝子は、これらに限定されるものではない。

本発明に用いるDDPS及びAKは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないものであることが好ましい。*E. coli*由来の野生型DDPSはL-リジンによるフィードバック阻害を受けることが知られており、*E. coli*由来の野生型AKIIIはL-リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって、メチロフィラス属細菌に導入する*dapA*及び*lysC*は、それぞれL-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPS及びAKIIIをコードするものであることが好ましい。以下、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPSを「変異型DDPS」、変異型DDPSをコードするDNAを「変異型*dapA*」と呼ぶことがある。また、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有する*E. coli*由来のAKIIIを「変異型AKIII」、変異型AKIIIをコードするDNAを「変異型*lysC*」と呼ぶことがある。

尚、本発明においては、DDPS及びAKは必ずしも変異型である必要はない。例えば、コリネバクテリウム属細菌由来のDDPSはもともとL-リジンによるフィードバック阻害を受けないことが知られている。

E. coli由来の野生型dapAの塩基配列を配列番号1に、同塩基配列によってコードされる野生型DDPSのアミノ酸配列を配列番号2に例示する。また、E. coli由来の野生型lysCの塩基配列を配列番号3に、同塩基配列によってコードされる野生型AKIIIのアミノ酸配列を配列番号4に例示する。

L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型DDPSをコードするDNAとしては、配列番号2に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有するDDPSをコードするDNAが挙げられる。また、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型AKIIIをコードするDNAとしては、配列番号4に示すアミノ酸配列において352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有するAKIIIをコードするDNAが挙げられる。

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、エシェリア属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

また、メチロフィラス属細菌で機能するベクターとは、例えばメチロフィラス属細菌で自律複製出来るプラスミドである。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えばpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y. D. Plasmid, 1986, 16, 161-167)、あるいはpMFY42 (gene, 44, 53(1990))、pRP301、pTB70 (Nature, 287, 396, (1980))等が挙げられる。

dapA及びlysCとメチロフィラス属細菌で機能するベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、dapA及びlysCを含むDNA断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。dapA及びlysCは、それぞれ別個のベクターに搭載してもよく、同一のベクターに搭載してもよい。

変異型DDPSをコードする変異型dapA及び変異型AKIIIをコードする変異型lysCを含むプラスミドとして、広宿主域プラスミドRSFD80が知られている (W095/160

42号)。同プラスミドで形質転換されたE. coli JM109株は、AJ12396と命名され、同株は1993年10月28日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM P-13936として寄託され、そして1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号が付与されている。RSFD80は、AJ12396株から、公知の方法によって取得することができる。

RSFD80に含まれている変異型dapAは、配列番号1に示す野生型dapAの塩基配列において塩基番号597のCがTに変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型DDPSは、配列番号2に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有する。また、RSFD80に含まれている変異型lysCは、配列番号3に示す野生型lysCの塩基配列において塩基番号1638のCがT変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型AKIIIは、配列番号4に示すアミノ酸配列において352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有する。

上記のように調製した組換えDNAをメチロフィラス属細菌に導入するには、十分な形質転換効率が得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法（Canadian Journal of Microbiology, 43. 197(1997)）が挙げられる。

DDPS活性及び／又はAK活性の増強は、dapA及び／又はlysCをメチロフィラス属細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。メチロフィラス属細菌の染色体DNA上にdapA及び／又はlysCを多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レベッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートなどが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、dapA及び／又はlysCをトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のdapA及び／又はlysCのコピー数が上昇する結果、DDPS活性及び／又はAK活性が増幅される。

DDPS活性及び／又はAK活性の増幅は、上記の遺伝子増幅による以外に、dapA及

び／又はlysCのプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される（特開平1-215280号公報参照）。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのP_Rプロモーター、P_Lプロモーター、tetプロモーター、amyEプロモーター、spacプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、dapA及び／又はlysCの発現が強化されることによってDDPS活性及び／又はAK活性が増幅される。発現調節配列の置換は、dapA及び／又はlysCのコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

遺伝子断片とベクターを連結して組換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。DNAの切断、連結、その他、染色体DNAの調製、PCR、プラスミドDNAの調製、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

DDPS活性及び／又はAK活性の増強に加えて、他のL-リジン生合成に関与する酵素の活性を増強してもよい。そのような酵素としては、ジヒドロジビコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ（以上、W096/40934号参照）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（特開昭60-87788号）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（特公平6-102028号）、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素等のジアミノピメリン酸経路の酵素、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ遺伝子等のアミノアジピン酸経路の酵素等が挙げられる。好ましくは、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素、ジヒドロジビコリン酸レダクターゼ及びジアミノピメリン酸脱炭酸酵素の少なくとも1種以上の酵素の活性が増強される。

メチロフィラス・メチロトロファス由来のアスパルトキナーゼ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素、ジヒドロジビコリン酸合成酵素、ジヒドロジビコ

リン酸レダクターゼ、及び、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素については後述する。

さらに、本発明の微生物は、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼがある（WO 95/23864参照）。

上記のL-リジン生合成に関与する酵素の活性を増強する手法は、以下に示す他のアミノ酸についても同様に適用することができる。

〔L-グルタミン酸〕

メチロフィラス属細菌へのL-グルタミン酸生産能は、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（特開昭61-268185号）、グルタミンシンターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（特開昭62-166890号、特開昭63-214189号）、アコニット酸ヒドラターゼ（特開昭62-294086号）、クエン酸シンターゼ（特開昭62-201585号、特開昭63-119688号）、ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ（特開昭60-87788号、特開昭62-55089号）、ビルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビルビン酸キナーゼ、ホスホエノールビルビン酸シンターゼ、エノラーゼ、ホスホグリセロムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルトースビスリン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ（特開昭63-102692号）、グルコースリン酸イソメラーゼ、グルタミン-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼ（WO 99/07853）等の酵素をコードするDNAを導入することによって、付与することができる。

さらに、本発明の微生物は、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、 α ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ（ α KGDH）、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シン

ターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1-ピロリンデヒドロゲナーゼ等がある。

〔L-スレオニン〕

L-スレオニン生産能は、例えば、アスパルトキナーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、ホモセリンキナーゼ及びスレオニンシンターゼの活性を増強することにより、付与又は増強することができる。これらの酵素の活性は、例えば、スレオニンオペロンを含有した組換えプラスミド（特開昭55-131397号公報、特開昭59-31691号公報、特開昭56-15696号公報、および特表平3-501682号公報参照）でメチロフィラス属細菌を形質転換することにより、増強することができる。

また、L-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を有するスレオニンオペロン（特公平1-29559号公報）、ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子（特開昭60-012995号）、又はホモセリンキナーゼ及びホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子（特開昭61-195695号）を増幅又は導入することによっても、生産性を付与又は増強することができる。

さらに、アスパラギン酸によるフィードバック阻害を解除する変異を有する変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNAを導入することによって、L-スレオニン生産能を向上させることができる。

〔L-バリン〕

L-バリンの生産能の付与は、例えば、制御機構が実質的に解除されたL-バリン生合成系遺伝子をメチロフィラス属細菌に導入することによって行うことができる。また、メチロフィラス属に属する微生物が保持するL-バリン生合成系遺伝子の制御機構が実質的に解除されるような変異を導入してもよい。

L-バリン生合成系遺伝子としては、例えば、*E. coli*の*ilvGME* DAオペロンが挙げられる。尚、*ilvA*遺伝子がコードするスレオニンデアミナーゼは、L-イソロイシン生合成系の律速段階であるL-スレオニンから2-ケト酪酸への脱アミノ化反応を触媒する。したがって、L-バリン合成系の反応を効率よく進行させるためには、スレオニンデアミナーゼ活性を発現しないオペロンを用い

ることが好ましい。このようなスレオニンデアミナーゼ活性を発現しない *ilvGMEDA* オペロンとしては、スレオニンデアミナーゼ活性を失うような変異が *ilvA* に導入された、又は *ilvA* が破壊された *ilvGMEDA* オペロン、あるいは *ilvA* が欠失した *ilvGMED* オペロンが挙げられる。

また、*ilvGMEDA* オペロンは、*L*-バリン及び／又は *L*-イソロイシン及び／又は *L*-ロイシンによるオペロンの発現調節（アテニュエーション）を受けるので、生成する *L*-バリンによる発現抑制を解除するために、アテニュエーションに必要な領域が除去又は変異されていることが好ましい。

上記のような、スレオニンデアミナーゼ活性を発現せず、アテニュエーションが解除された *ilvGMEDA* オペロンは、野生型 *ilvGMEDA* オペロンを変異処理し、または遺伝子組換え技術を用いて改変することにより得られる（以上、WO 96/06926 参照）。

〔*L*-ロイシン〕

L-ロイシンの生産能の付与または増強は、例えば、上記 *L*-バリン生産に必要な性質に加えて、制御機構が実質的に解除された *L*-ロイシン生合成系遺伝子をメチロフィラス属に属する微生物に導入することによって行われる。また、メチロフィラス属に属する微生物が保持する *L*-ロイシン生合成系遺伝子の制御機構が実質的に解除されるような変異を導入してもよい。このような遺伝子として、例えば、*L*-ロイシンによる阻害が実質的に解除された *leuA* 遺伝子が挙げられる。

〔*L*-イソロイシン〕

L-イソロイシンは、例えば、*E. coli* 由来の *L*-スレオニンによる阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼ *I*-ホモセリンドヒドロゲナーゼ *I* をコードする *thrA* 遺伝子を含む *thrABC* オペロンと、*L*-イソロイシンによる阻害が実質的に解除されたスレオニンデアミナーゼをコードする *ilvA* 遺伝子を含みかつアテニュエーションに必要な領域が除去された *ilvGMEDA* オペロンとを導入することにより、*L*-イソロイシン生産性を付与することができる（特開平 8-47397 参照）。

〔その他のアミノ酸〕

L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-スレオニン及びL-イソロイシンは、メチロフィラス属細菌のホスホエノールピルビン酸の生産能を上昇させることによって、生合成が強化され得る（WO 97/08333）。

L-フェニルアラニン及びL-チロシンは、脱感作型コリスミン酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドラターゼ（CM-PDT）遺伝子（特開平5-236947号、特開昭62-130693号公報参照）、脱感作型3-デオキシ-D-アラビノヘプツロン酸-7-リン酸シンターゼ（DS）遺伝子（特開平5-236947号、特開昭61-124375号公報参照）を増幅又は導入することによって、生産性が向上する。

また、L-トリプトファンは、脱感作型アントラニル酸合成酵素をコードする遺伝子を含むトリプトファンオペロン（特開昭57-71397号、特開昭62-244382号、米国特許第4,371,614）を増幅又は導入することによって、生産性が向上する。

なお、本明細書において、酵素の「活性が増強されている」とは、通常には、野生株よりも細胞内のその酵素活性が高いことを意味し、遺伝子組換え技術等による改変によりその酵素活性が増強された菌株を得た場合には、改変前の菌株よりも細胞内のその酵素活性が高いことを意味する。また、酵素の「活性が低下している」とは、通常には、野生株よりも細胞内のその酵素活性が低いことを意味し、遺伝子組換え技術等による改変によりその酵素活性が低下した菌株を得た場合には、改変前の菌株よりも細胞内のその酵素活性が低いことを意味する。

上記のようにして得られるL-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することにより、L-アミノ酸を製造することができる。

また、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該細菌の菌体中にL-アミノ酸を生産蓄積させることにより、メチロフィラス属細菌の野生株に比べてL-アミノ酸含量が増加したメチロフィラス属細菌菌体を製造することができる。

本発明で用いられる微生物は、通常メタノール資化性微生物の培養に用いられ

る方法で培養することができる。本発明で用いられる培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。

メタノールを主たる炭素源として用いると、L-アミノ酸を安価に製造することができる。メタノールは、主たる炭素源として用いる場合は、培地中に通常0.001~30%添加する。窒素源としては硫酸アンモニウムなどを培地に添加して用いる。これらの他に、通常、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンなどの微量成分が少量添加される。

培養は、通常には、振とう培養又は通気攪拌培養などの好気条件下、pH5~9、温度20~45℃に保持して行われ、通常24~120時間で終了する。

培養物からのL-アミノ酸の採取は、通常、イオン交換樹脂法、沈殿法、その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

また、メチロフィラス属細菌菌体の培地からの分離は、通常の微生物菌体の分離法によって分離することができる。

< 2 > 本発明の遺伝子

本発明のDNAは、メチロフィラス・メチロトロファス由来のアスパルトキナーゼ（以下「AK」ともいう）、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素（以下「ASD」ともいう）、ジヒドロジピコリン酸合成酵素（以下「DDPS」ともいう）、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ（以下「DDPR」ともいう）、及び、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素（以下「DPDC」ともいう）の各々の酵素をコードする遺伝子である。

本発明のDNAは、例えば、メチロフィラス・メチロトロファスの遺伝子ライブラリーを用いて、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCを欠損した微生物の変異株を形質転換し、栄養要求性が回復したクローンを選択することによって取得することができる。

メチロフィラス・メチロトロファスの遺伝子ライブラリーは、例えば以下のよう
に作製することができる。まず、メチロフィラス・メチロトロファス野生株、
例えばメチロフィラス・メチロトロファスAS1株（NCIMB10515）から全染色体D

NAを、Saitoらの方法 (Saito, H. and Miura, K. (1963) *Biochem. Biophys. Acta*, 72, 619-629) 等により調製し、適当な制限酵素、例えばSau3AI又はAluI等で部分分解して、種々の断片混合物を得る。切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。

ついで、切断された染色体DNA断片を、大腸菌 (エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)) 細胞内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素と同一末端塩基配列を生じさせる制限酵素をベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。次いで、上記のようにして得た染色体DNA断片混合物と開裂切断されたベクターDNAを混合し、これにDNAリガーゼ、好ましくはT4DNAリガーゼを作用させて組換えDNAを得る。

得られた組換えDNAを用いて、大腸菌、例えば大腸菌JM109株等を形質転換し、形質転換体の培養液から組換えDNAを調製することによって、遺伝子ライブラリー液が得られる。この形質転換は D.M.Morrisonの方法 (*Methods in Enzymology* 68, 326, 1979) あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1970)) 等により行うことができる。後記実施例では、エレクトロポレーション法を採用した。

前記ベクターとしては、pUC19、pUC18、pUC118、pUC119、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218、pSTV28、pSTV29等が挙げられ、その他ファージベクターも使用することができる。例えば、pUC118、pUC119にはアンピシリン耐性遺伝子が、pSTV28及びpSTV29にはクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれているので、培地中にアンピシリン又はクロラムフェニコールを含有させることにより、ベクターあるいは組換えDNAを保持する形質転換体のみを生育させることができる。

形質転換体を培養し、菌体から組換えDNAを回収する方法としては、アルカリSDS法等が挙げられる。

上記のようにして得られたメチロフィラス・メチロトロファスの遺伝子ライブラリー液を用いて、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCを欠損した微生物の変異株を

形質転換し、栄養要求性が回復したクローンを選択する。

AKを欠損した微生物の変異株としては、3種類のAKをコードする遺伝子 (thrA, metLM, lysC) を欠損したE. coli GT3が挙げられる。ASDを欠損した微生物の変異株としては、E. coli Hfr3000 U482 (CGSC 5081株)が挙げられる。DDPSを欠損した微生物の変異株としては、E. coli AT997(CGSC 4547株)が挙げられる。DDPRを欠損した微生物の変異株としては、E. coli AT999 (CGSC 4549株)が挙げられる。DPDCを欠損した微生物の変異株としては、E. coli AT2453(CGSC 4505株)が挙げられる。これらの変異株は、E. coli Genetic Stock Center (米国コネチカット州ニューヘブレン(New Haven)06511-7444、エール大学生物学 部オズボーン記念研究所 (Yale University, Dept. Biology, Osborn Memorial Labs.)、P.O. Box 6666) から入手できる。

上記変異株は、いずれもM9最少培地では生育できないが、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、これらの遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能となる。したがって、最少培地で生育可能な形質転換株を選択し、同株から組換えDNAを回収すれば、各々の酵素をコードする遺伝子を含むDNA断片が得られる。また、E. coli AT999 (CGSC 4549株)は、L培地等の完全培地であっても、ジアミノピメリン酸を添加しない場合には生育が非常に遅いが、メチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPRをコードする遺伝子を保持する形質転換株は当該遺伝子が機能することにより、正常な生育が観察される。したがって、L培地で正常に生育する形質転換株を選択することによっても、DDPRをコードする遺伝子を保持する形質転換株が得られる。

得られた組換えDNAから挿入DNA断片を取り出し、塩基配列を決定すると、各々の酵素のアミノ酸配列及びそれらをコードする遺伝子の塩基配列が決定される。

本発明のAKをコードする遺伝子 (以下「ask」ともいう) は、配列表配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するAKをコードする。ask遺伝子として具体的には、配列番号5の塩基番号からなる塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、本発明のask遺伝子は、配列番号6に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、各アミノ酸に対するコドン等を他のコドンに

置き換えた配列であってもよい。

本発明のASDをコードする遺伝子（以下「asd」ともいう）は、配列表配列番号8に示されるアミノ酸配列を有するASDをコードする。asd遺伝子として具体的には、配列番号7の塩基番号98～1207からなる塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、本発明のasd遺伝子は、配列番号8に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、各アミノ酸に対するコドン等を他のコドンに置き換えた配列であってもよい。

本発明のDDPSをコードする遺伝子（以下「dapA」ともいう）は、配列表配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するDDPSをコードする。dapA遺伝子として具体的には、配列番号9の塩基番号1268～2155から塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、本発明のdapA遺伝子は、配列番号10に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、各アミノ酸に対するコドン等を他のコドンに置き換えた配列であってもよい。

本発明のDDPRをコードする遺伝子（以下「dapB」ともいう）は、配列表配列番号12に示されるアミノ酸配列を有するDDPRをコードする。dapB遺伝子として具体的には、配列番号11の塩基番号2080～2883からなる塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、本発明のdapB遺伝子は、配列番号12に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、各アミノ酸に対するコドン等を他のコドンに置き換えた配列であってもよい。

本発明のDPDCをコードする遺伝子（以下「lysA」ともいう）は、配列表配列番号14に示されるアミノ酸配列を有するDPDCをコードする。lysA遺伝子として具体的には、配列番号13の塩基番号751～1995からなる塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、本発明のlysA遺伝子は、配列番号14に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、各アミノ酸に対するコドン等を他のコドンに置き換えた配列であってもよい。

また、本発明の各酵素遺伝子は、各々配列番号6、8、10、12又は14に示すアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等の変異を含むアミノ酸配列からなるものであって、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDC活性を有するタンパク質をコードするものであってもよい。

ここで「1若しくは複数」とは、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～2個である。

上記のようなAK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCをコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びAK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCをコードするDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCを保持する微生物の種や菌株の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) も含まれる。

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物のAK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDC活性を調べることにより、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するAK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列番号5の塩基番号510～1736からなる塩基配列、配列番号7の塩基番号98～1207からなる塩基配列、配列番号9の塩基番号1268～2155からなる塩基配列、配列番号11の塩基番号2080～2883からなる塩基配列、配列番号13の塩基番号751～1995からなる塩基配列、又はこれらの塩基配列の一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDC活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。なお、本明細書で、「塩基配列又はその一部を有する」とは、その塩基配列もしくはその一部又はそれに相補的な塩基配列を有することを意味する。

ここでいう「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件は、プローブの塩基配列や長さによって異なるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば40%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

プローブとして、各遺伝子の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、各遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、各遺伝子を含むDNA断片を鋳型とするPCR (polymerase chain reaction) 反応によって作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

上記のような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎ、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDC活性を測定することによって容易に取り除くことができる。

本発明により、メチロフィラス・メチロトロファス由来のAK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDC及びそれらをコードする遺伝子の塩基配列が明らかにされたので、これらの配列を基に作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、メチロフィラス・メチロトロファス遺伝子ライブラリーから、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCをコードするDNA配列を得ることができる。また、これらの酵素をコードするDNA配列は、上記ヌクレオチド配列を基に作製したオリゴヌクレオチドプライマーを用い、PCR法によりメチロフィラス・メチロトロファス染色体DNAから増幅することによっても得られる。

上記遺伝子は、メチロフィラス属細菌のL-リジン生産性を増強するのに好適に利用することができる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

試薬は特に指定しない限り和光純薬、あるいはナカライテスク社製のものを用いた。各実施例で用いる培地の組成は以下に示すとおりである。いずれの培地もpHはNaOHあるいはHClで調整した。

(L培地)

バクトトリプトン (ディフコ社製) 10g/L

酵母エキス (ディフコ社製) 5g/L

NaCl 5g/L

[120°C、20分間の蒸気滅菌を行った。]

(L寒天培地)

L培地

バクトアガー (ディフコ社製) 15g/L

[120°C、20分間の蒸気滅菌を行った。]

(SOC培地)

バクトトリプトン (ディフコ社製) 20g/L

酵母エキス (ディフコ社製) 5g/L

10mM NaCl

2.5mM KCl

10mM MgSO₄

10mM MgCl₂

20mM グルコース

[マグネシウム溶液及びグルコースを除いて、蒸気滅菌した(120°C、20分間)後、予め0.22μmのフィルターを通した2Mのマグネシウム保存液 (1M MgSO₄、1M MgCl₂) 並びに2Mグルコース溶液を加え、再び0.22μmのフィルターを通した。]

(121M1培地)

K₂HPO₄ 1.2g/L

KH₂PO₄ 0.62g/L

NaCl 0.1g/L

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05g/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0mg/L
H_3BO_3	10 $\mu\text{g/L}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5 $\mu\text{g/L}$
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{g/L}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	70 $\mu\text{g/L}$
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{g/L}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5 $\mu\text{g/L}$

メタノール 1%(vol/vol) pH 7.0

[メタノール以外は121°C、15分間の蒸気滅菌を行った。良く冷めてからメタノールを添加した。]

(121生産培地の組成)

メタノール	2%
リン酸二カリウム	0.12%
リン酸一カリウム	0.062%
塩化カルシウム六水塩	0.005%
硫酸マグネシウム七水塩	0.02%
塩化ナトリウム	0.01%
塩化第二鉄六水塩	1.0mg/L
硫酸アンモニウム	0.3%
硫酸第二銅五水塩	5 $\mu\text{g/L}$
硫酸第一マンガン五水塩	10 $\mu\text{g/L}$
モリブデン酸ナトリウム二水塩	10 $\mu\text{g/L}$
ホウ酸	10 $\mu\text{g/L}$
硫酸亜鉛七水塩	70 $\mu\text{g/L}$
塩化第一コバルト六水塩	5 $\mu\text{g/L}$
炭酸カルシウム (関東化学製)	3%

(pH7.0)

(121M1寒天培地)

121M1培地

バクトアガー (ディフコ社製) 15g/L

[メタノール以外は121°C、15分間の蒸気滅菌を行った。良く冷めてからメタノールを添加した。]

(M 9 最少培地)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 16g/L

KH_2PO_4 3g/L

NaCl 0.5g/L

NH_4Cl 1g/L

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 246.48mg/L

グルコース 2g/L

pH7.0

[MgSO_4 、およびグルコースは別に殺菌(120°C、20分間)して加えた。また、必要に応じて適量のアミノ酸およびビタミンを添加した。]

(M 9 最少寒天培地)

M 9 最少培地

バクトアガー (ディフコ社製) 15g/L

実施例 1 L-リジン生産菌の創製 (1)

(1) メチロフィラス属細菌への変異型lysC及び変異型dapAの導入

変異型lysC及び変異型dapAは、これらを含む公知のプラスミドRSFD80 (W095/16042号参照) を用いてメチロフィラス属細菌に導入した。RSFD80は、RSF1010の誘導体である広宿主域ベクタープラスミドpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsyganov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167) に由来するプラスミドpVIC40 (W090/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報) のテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター (tetP) の下流に、tetPに対して転写方向が正方向となるようにE. coli由来の変異型dapA及び変異型lysCがこの順序で配置されている。こ

の変異型dapAは、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された変異型DDP Sをコードしている。また、前記変異型lysCは、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された変異型AKIIIをコードしている。

RSFD80は、以下に示すようにして構築された。プラスミドpdapAS24上にある変異型dapAをpVIC40のテトラサイクリン耐性遺伝子プロモーターの下流に連結し、図1に示す様にしてRSF24Pを得た。次に、このRSF24Pと、変異型lysCを含むpLLC*80から、変異型dapA及び変異型lysCを有するプラスミドRSFD80を図2に示す様にして作製した。すなわち、pVIC40はスレオニンオペロンを含んでいるが、RSFD80ではこのスレオニンオペロンが変異型dapAを含むDNA断片及び変異型lysCを含むDNA断片と置換されている。

RSFD80プラスミドで形質転換された*E. coli* JM109株は、AJ12396と命名され、同株は、1993年10月28日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM P-13936として寄託され、そして1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号が付与されている。

E. coli AJ1239株を、ストレプトマイシンを20mg/L含む30mlのLB培地で30℃で12時間培養して得た菌体から、Wizard[®] Plus Midipreps DNA Purification System(プロメガ社より市販)を用いてRSFD80プラスミドを精製した。

上記のようにして得られたRSFD80プラスミドを、エレクトロポレーション法(Canadian Journal of Microbiology, 43, 197(1997))によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株(NCIMB10515)に導入した。なお、対照として、RSFD80プラスミドを作製する際に用いたpVIC40プラスミドよりスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つpRSプラスミド(特表平3-501682号公報参照)を、RSFD80と同様にしてAS1株に導入した。

(2) *E. coli*由来の変異型lysC及び変異型dapAを保持するメチロフィラス属細菌のAKIII活性

RSFD80プラスミドを保持するメチロフィラス・メチロトロファスAS1株(以下、「AS1/RSFD80」と略すことがある)と、pRSプラスミドを保持するメチロフィラス・メチロトロファスAS1株(以下、「AS1/pRS」と略すことがある)より、無細

胞抽出液を調製し、AK活性を測定した。無細胞抽出液（粗酵素液）は次のようにして調製した。AS1/RSFD80およびAS1/pRS株を、ストレプトマイシン20mg/Lを含む上記組成の121生産培地に植菌し、37°Cで34時間振とう培養し、炭酸カルシウムを除いた後、集菌した。

上記のようにして得られた菌体を、0°Cの条件下で0.2% KClで洗浄し、10mM $MgSO_4$, 0.8M $(NH_4)_2SO_4$ および0.03M β -メルカプトエタノールを含む20mMリン酸カリウム緩衝液（pH7）に懸濁し、超音波処理（0°C、200W、10分）で菌体を破碎した。菌体破碎液を0°Cの条件下で、33,000rpmで30分間遠心し、上清をとってこれに80%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加し、0°Cで1時間放置した後遠心し、ペレットを10mM $MgSO_4$, 0.8M $(NH_4)_2SO_4$ および0.03M β -メルカプトエタノールを含む20mMリン酸カリウム緩衝液（pH7）に溶解した。

AK活性の測定はスタットマンらの方法（Stadtman, E. R., Cohen, G. N., LeBaras, G., and Robichon-Szulmajster, H., J. Biol. Chem., 236, 2033(1961))に従った。すなわち、下記組成の反応液を30°Cで45分インキュベートし、 $FeCl_3$ 溶液（2.8N HCl: 0.4ml, 12%TCA: 0.4ml, 5% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ /0.1N HCl: 0.7ml）を加えて発色させ、これを遠心後、上清の540nmでの吸光度を測定した。活性は1分間に生成するヒドロキサム酸の量で表示（1U=1 μ mol/分）した。モル吸光係数は600とした。なお、反応液からアスパラギン酸カリウムをのぞいたものをブラックとした。酵素活性を測定する際、酵素反応液中に種々の濃度のL-リジンを加え、L-リジンによる阻害の度合いを調べた。結果を表1に示した。

（反応液組成）

reaction mixture * ¹	0.3ml
ヒドロキシルアミン溶液 * ²	0.2ml
0.1Mアスパラギン酸カリウム(pH7.0)	0.2ml
酵素液	0.1ml
水（バランス）	計 1ml

*1: 1M Tris-HCl(pH8.1) 9ml, 0.3M $MgSO_4$ 0.5ml, 0.2M ATP(pH7.0) 5ml

*2: 8Mヒドロキシルアミン溶液を直前にKOHで中和したもの

表 1

菌株	AK活性 (比活性 ^{*1})	L-リジン5mM存在 時の比活性	阻害解除度 ^{*2} (%)
AS1/pRS	7.93	9.07	114
AS1/RSFD80	13.36	15.33	115

*1 : nmol/分/mgタンパク質

*2 : L-リジン5mM存在時の活性保持率

表1に示すように、RSFD80プラスミドの導入によりAK活性が約1.7倍に上昇した。また、RSFD80プラスミドにコードされるE. coli由来のAKはL-リジンにより阻害が完全に解除されていることが確認された。また、AS1株が元来保持するAKは、L-リジン単独では阻害を受けないことがわかった。尚、本発明者らは、AS1株由来のAKは、L-リジンとL-スレオニンが反応液中に各2mMずつ存在するときに、100%阻害されることを発見している（協奏阻害）。

(3) E. coli由来の変異型lysC及び変異型dapAを保持するメチロフィラス属細菌によるL-リジンの製造

次に、AS1/RSFD80およびAS1/pRS株をストレプトマイシン20mg/Lを含む121生産培地に植菌し、37°Cで34時間振とう培養した。培養終了後、菌体及び炭酸カルシウムを遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。結果を表2に示す。

表 2

菌株	L-リジン塩酸塩の生産量 (g/L)
AS1/pRS	0
AS1/RSFD80	0.3

実施例2 L-リジン生産菌の創製(2)

(1) 広宿主域ベクターへのtacプロモーター領域の組込み

L-リジン(Lys)の生合成に関与する酵素をメチロフィラス・メチロトロファス内で高生産させる為に、E.coliで多用されるtacプロモーターを、目的酵素の遺伝子発現用に用いた。

tacプロモーター領域は、pKK233-3(ファルマシア社製)のDNAをPCRの鋳型に用い、配列番号15及び16の塩基配列をもつDNA断片をプライマーとして、耐熱性DNAポリメラーゼによるPCRにて増幅し取得した。PCRは、94°C-20秒、60°C-30秒及び72°C-60秒のサイクルを30回という条件で行った。その後、その増幅DNA断片を回収し、制限酵素EcoRI及びPstIにて処理した。一方、広宿主域ベクターpRS(特表平3-501682号公報参照)も同じ制限酵素にて切断し、それぞれの制限酵素切断端に、上記のtacプロモーター領域を含むDNA断片を組み入れ、pRS-tacを作成した。

(2) dapA遺伝子(ジヒドロジピコリン酸合成酵素遺伝子)発現プラスミドpRS-dapA24およびlysC遺伝子(アスパルトキナーゼ遺伝子)発現プラスミドpRS-lysC80の作成

Lysによる酵素活性のフィードバック阻害が幾分解除されたジヒドロジピコリン酸合成酵素の変異型遺伝子(dapA*24)を(1)に記載した方法にて作成したプラスミドpRS-tacに組み入れた。

まずdapA*24遺伝子領域はRSFD80(実施例1参照)のDNAを鋳型に、配列番号17及び18の塩基配列をもつDNA断片をプライマーとしてPCRにて増幅して取得した。PCRは、94°C-20秒、60°C-30秒及び72°C-90秒のサイクルを30回という条件で行った。その断片を制限酵素Sse8387I及びXbaIにて処理し、それぞれの切断端をもつdapA*24遺伝子断片を調製した。一方、pRS-tacも、同様にSse8387Iで処理し、XbaIにて部分消化した。そこへ上記のdapA*24遺伝子断片をT4-DNAリガーゼにて連結することでpRS-dapA24を得た。

また同様に、Lysによる酵素活性のフィードバック阻害が幾分解除されたアスパルトキナーゼの遺伝子(lysC*80)も、RSFD80のDNAを鋳型にし、配列番号19

及び20の塩基配列をもつDNA断片をプライマーとしたPCRにて取得した。PCRは、94°C-20秒、60°C-30秒及び72°C-90秒のサイクルを30回という条件で行った。得られたDNA断片は制限酵素Sse8387I及びSapIにて処理した。一方、ベクターであるpRS-tacも制限酵素Sse8387I及びSapIにて処理し、これに、上記のlysC*80遺伝子断片をT4 DNAリガーゼにて連結することで、pRS-lysC80を作成した。

(3) pRS-dapA24またはpRS-lysC80のメチロフィラス・メチロトロファスへの導入と培養評価

上記のようにして得られたpRS-dapA24及びpRS-lysC80を、それぞれ、エレクトロポレーション法によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株(NCIMB10515)に導入し、AS1/pRS-dapA24及びAS1/pRS-lysC80を得た。それぞれストレプトマイシン20mg/Lを含む121生産培地に植菌し、37°Cで48時間振とう培養した。同様に対照株としてpRSを有するAS1株も培養した。培養終了後、菌体及び炭酸カルシウムを遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計(日本分光製、高速液体クロマトグラフィー)で定量した。結果を表3に示す。

表 3

菌株	L-リジン塩酸塩の生産量 (g/L)
AS1/pRS	< 0.01
AS1/pRS-lysC80	0.06
AS1/pRS-dapA24	0.13

実施例 3 L-リジン生産菌の創製 (3)

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株(NCIMB10515)を、121M1培地に植菌し37°Cで15時間培養した。得られた菌体を常法によりNTG処理(NTG濃度100mg/L、37°C、5分)し、S-(2-アミノエチル)-システイン(AEC)7g/L、及びL-スレオニン3g/Lを含有する121M1寒天培地に塗布した。これを、37°Cで2~8日間培養し、生じたコロニーを釣菌分離して、AEC耐性株を取得した。

上記のAEC耐性株を、121生産培地に植菌し、好氣的に37°Cで38時間培養した。培養終了後、培地から菌体及び炭酸カルシウムを遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。親株よりL-リジン生産能が向上した株を選択し、メチロフィラス・メチロトロファスAR-166株と命名した。親株（AS1株）及びAR-166株のL-リジン生産量を表4に示す。

表 4

菌株	L-リジン塩酸塩の生産量 (mg/L)
AS1	5.8
AR-166	80

メチロフィラス・メチロトロファスAR-166株は、プライベートナンバーAJ13608が付与され、1999年6月10日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM P-17416として寄託され、そして2000年3月31日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7112が付与されている。

実施例4 L-スレオニン生産菌の創製

(1) メチロフィラス属細菌へのスレオニンオペロンプラスミドの導入

E.coli由来のスレオニンオペロンを搭載したプラスミドpVIC40 (W090/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報)をエレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197(1997))によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515)に導入し、AS1/pVIC40株を得た。対照として、pVIC40プラスミドよりスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つプラスミドpRSプラスミド(特表平3-501682号公報)をpVIC40と同様にしてAS1株に導入し、AS1/pRS株を得た。

(2) E.coli由来のスレオニンオペロンを保持するメチロフィラス属細菌による
L-スレオニンの製造

AS1/pVIC40及びAS1/pRS株を、ストレプトマイシン20mg/L、L-バリン1g/l及びL-ロイシン1g/lを含む121生産培地に植菌し、37°Cで50時間振とう培養を行った。培養終了後、菌体及び炭酸カルシウムを遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-スレオニン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。結果を表5に示す。

表 5

菌株	L-スレオニンの生産量 (mg/L)
AS1/pRS	15
AS1/pVIC40	30

実施例 5 分岐鎖アミノ酸生産菌の創製

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) を、121M1培地に植菌し、37°Cで15時間培養した。得られた菌体を常法によりNTG処理 (NTG濃度100mg/L、37°C、5分) し、カザミノ酸 (DIFCO社製) 0.5%を含有する121M1寒天培地に塗布した。これを37°Cで2～8日間培養し、コロニーを形成させた。これらのコロニーを釣菌分離して、121M1寒天培地及びカザミノ酸0.5%を含有する121M1寒天培地に植菌し、前者に比べて後方で生育がよい株を選択し、これをカザミノ酸要求株とした。こうして、500株のNTG処理株から9株のリーキーなカザミノ酸要求株を得た。これらのカザミノ酸要求株から、L-バリン、L-ロイシン及びL-イソロイシンを親株よりも多く培地中に蓄積する株を1株得た。これをメチロフィラス・メチロトロファスC138株と命名した。

メチロフィラス・メチロトロファスC138株は、プライベートナンバーAJ13609が付与され、1999年6月10日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に受託番号FERM

P-17417として寄託され、そして2000年3月31日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7113が付与されている。

親株 (AS1株) 及びC138株を、121生産培地に植菌し、好氣的に37°Cで34時間培養した。培養終了後、培地から菌体及び炭酸カルシウムを遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-バリン、L-ロイシン及びL-イソロイシンの濃度をアミノ酸分析計 (日本分光製、高速液体クロマトグラフィー) で定量した。結果を表6に示す。

表 6

菌株	L-バリン (mg/L)	L-ロイシン (mg/L)	L-イソロイシン (mg/L)
AS1	7.5	5.0	2.7
C138	330	166	249

実施例6 メチロフィラス・メチロトロファスAS1株の染色体DNAライブラリーの作製

(1) メチロフィラス・メチロトロファスAS1株からの染色体DNAの調製

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) を試験管内5mlの121M1培地に一白金耳植菌し、37°C一晩振盪培養した。得られた培養液を500ml容坂口フラスコ内の50mlの121M1培地に1%となるように接種し、37°Cにて一晩振盪培養した後、遠心分離にて集菌した。50mlのTEN溶液 (50mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA及び20mM NaClからなる溶液 (pH8.0)) に懸濁し、遠心分離して集菌後、5mg/mlのリゾチームおよび10 μ g/mlのリボヌクレアーゼAを含む5mlのTEN溶液に再懸濁した。37°Cで30分間保温後、プロテイナーゼK及びラウリル硫酸ナトリウムを終濃度が各々10 μ g/ml及び0.5 % (wt/vol) となるように添加した。

70°Cで2時間保温後、等量の飽和フェノール溶液 (10mM Tris-HCl (pH 8.0) で飽和したフェノール溶液) を加えて混合した後、遠心分離して上清を回収し、等量のフェノール・クロロホルム溶液 (フェノール : クロロホルム : イソアミル

アルコール＝25：24：1)を加えて混合し、遠心分離した。上清を回収後、等量のクロロホルム溶液(クロロホルム：イソアミルアルコール＝24：1)を加えて同様の抽出操作を繰り返した。上清に1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)と2.5容のエタノールを加えて染色体DNAを沈殿させた。沈殿を遠心分離して回収後、70%のエタノールで洗浄し、真空乾燥させ、TE溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0))適量に溶解した。

(2) 遺伝子ライブラリーの調製

(1)で得られた染色体DNA(1 μ g/ μ l)50 μ l、H緩衝液(500mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10mM ジチオスレイトール, 1000mM NaCl (pH7.5))20 μ l、制限酵素Sau3AI(宝酒造製)8単位を、全容200 μ l中で37°Cにおいて10分間反応させた後、200 μ lのフェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、0.8%アガロースゲルにて分離し、2～5キロベースペア(以下「kbp」と記載)に相当するDNAを、ConcertTM Rapid Gel Extraction System (DNA回収キット、GIBCO BRL社製)を用いて回収した。このようにして分画したサイズをもつDNAの溶液を50 μ l得た。

一方、プラスミドpUC118(宝酒造製)2.5 μ g、K緩衝液(200mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10mM ジチオスレイトール, 1000mM KCl (pH8.5))2 μ l、制限酵素BamHI(宝酒造製)10単位を、全容20 μ l中で37°Cにおいて2時間反応させた後、子牛小腸アルカリフォスファターゼ(宝酒造製)20単位を添加して、さらに30分間反応させた。等量のフェノール・クロロホルム溶液を加えて混合、遠心分離し、上清を回収後、等量のクロロホルム溶液を加えて同様の抽出操作を繰り返した。上清に1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)と2.5容のエタノールを加えてDNAを沈殿させた。このDNAを遠心分離して回収後、70%のエタノールで洗浄し、真空乾燥させ、TE溶液に溶解した。

以上のように調製した染色体DNAのSau3AI消化物と、pUC118のBamHI消化物を、Ligation Kit ver.2(宝酒造製)を用いて連結させた。反応液に1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)と2.5容のエタノールを加えてDNAを沈殿させた。これを遠心分離して回収後、70%のエタノールで洗浄し、真空乾燥させ、TE溶液に溶解した(リガーゼ液A)。

上記の操作と同様にして、染色体DNAを制限酵素AluI(宝酒造製)にて部分消化した断片とプラスミドpSTV29(宝酒造製)をSmaIにて消化した断片を連結したものも調製した(リガーゼ液B)。

E. coli JM109を試験管内5mlのL培地に一白金耳植菌し、37°Cで一晩振盪培養した。得られた培養液を500ml容坂口フラスコ内の50mlのL培地に1%となるように接種し、37°Cにて、OD₆₆₀が0.5~0.6となるまで培養した後、15分間氷冷した。4°Cで遠心分離して集菌した。菌体を50mlの氷冷した水に懸濁し、遠心分離して菌を洗浄した。この操作をもう一度繰り返した後、50mlの氷冷した10%グリセロール溶液に懸濁し、遠心分離して菌を洗浄した。菌体と同じ容量の10%グリセロール溶液に懸濁して50 μ lずつ分注した。各50 μ l容量分の細胞に対して、上記で調製したリガーゼ液Aあるいはリガーゼ液Bをそれぞれ1 μ l加え、BioRad社製のエレクトロポレーション装置専用(0.1cm幅)のキュベット(予め氷冷)に混合液を移した。

装置の設定を1.8kV、25 μ F、パルスコントローラーの設定を200 Ω にした。キュベットを装置にセットし、パルスを印加した。印加後、直ちに氷冷したSOC培地1mlを加え、滅菌した試験管に移し、37°Cで1時間振盪培養した。抗生物質を含むL寒天培地(リガーゼ液Aを用いた場合は100 μ g/mlのアンピシリン、リガーゼ液Bを用いた場合は20 μ g/mlクロラムフェニコール)にそれぞれの菌体培養液を塗布し、37°Cで一晩保温した。各寒天培地上に出現したコロニーを各々掻き集め、500ml容坂口フラスコ内の、各々の抗生物質を含むL培地50mlに各々接種し、37°Cで2時間振盪培養した。アルカリSDS法にて各々の培養液からプラスミドDNAを抽出し、それぞれ遺伝子ライブラリー液Aおよび遺伝子ライブラリー液Bとした。

実施例7 メチロフィラス・メチロトロファスAS1株のリジン生合成遺伝子のクローニング

(1) アスパルトキナーゼ(AK)をコードする遺伝子のクローニング

3つのAKをコードする遺伝子(thrA, metLM, lysC)を欠損したE. coli GT3を、上記と同じエレクトロポレーション法で、遺伝子ライブラリー液Bを用いて形質

転換した。形質転換液に、 $20\mu\text{g/ml}$ のジアミノピメリン酸を含むSOC培地を添加し、 37°C にて振盪培養後、培養液を $20\mu\text{g/ml}$ のジアミノピメリン酸及び $20\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールを含むL培地に塗布しコロニーを出現させた。これをマスタープレートとして、 $20\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールを含むM9寒天培地へのレプリカを行い、 37°C にて2～3日間保温した。宿主はAK活性を有さないためにジアミノピメリン酸を含んでいないM9最少培地において生育できないのに対し、メチロフィラス・メチロトロファス由来のAKをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能となる。

約3000個の形質転換体から2個がM9培地にコロニーを形成した。M9培地で出現したコロニーよりプラスミドを抽出し、解析を行ったところ、プラスミド上に挿入断片の存在を確認した。各々のプラスミドをpMMASK-1、pMMASK-2と命名した。これらのプラスミドを用いて、再度E. coli GT3を形質転換したところ、形質転換体はM9最少培地にて生育した。さらにこれらのプラスミドを各々含む形質転換体を $20\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールを含むL培地にて一夜培養し、培養液を遠心分離して集菌後、超音波破碎にて細胞抽出液を調製し、Miyajimaらの方法 (Journal of Biochemistry (Tokyo), vol.63, 139-148 (1968)) に従いAK活性を測定した (図3、pMMASK-1、pMMASK-2)。なお、ベクターpSTV29を保持するGT3株を、 $20\mu\text{g/ml}$ のジアミノピメリン酸及び $20\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールを含むL培地にて同様に培養し、AK活性を測定した (図3、Vector)。その結果、ベクターのみを保持する形質転換体に比べて、挿入断片を有する2つのクローンには有意にAK活性の増加が認められたので、pSTV29上にクローニングできた遺伝子はメチロフィラス・メチロトロファス由来のAKをコードする遺伝子であることが判明した。この遺伝子をaskと命名した。

ask遺伝子のDNA塩基配列はダイデオキシ法にて決定した。pMMASK-1とpMMASK-2は共通の断片を含んでいることがわかった。このようにして得られたメチロフィラス・メチロトロファス由来ask遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を、配列番号5に示した。また、同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号5及び6に示す。

(2) アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素 (ASD) をコードする遺伝子の

クローニング

asd遺伝子を欠損したE. coli Hfr3000 U482 (CGSC 5081株)を、上記と同様にして、エレクトロポレーション法で遺伝子ライブラリー液Bを用いて形質転換した。形質転換液に、20 μ g/mlのジアミノピメリン酸を含むSOC培地を添加し、37℃にて振盪培養後、遠心分離にて集菌した。菌体をL培地に懸濁後、遠心分離にて洗浄を行った。同様の洗浄操作をもう一度繰り返し、菌体をL培地に懸濁後、20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。宿主はasd遺伝子を欠損しているために、ジアミノピメリン酸を含んでいないL培地では生育が非常に遅い。これに対してメチロフィラス・メチロトロファス由来のASDをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりL培地においても正常な生育が観察されると予想される。さらにM9最少培地において、宿主E. coliは生育できないのに対し、メチロフィラス・メチロトロファス由来のASDをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能となる。そこでL培地で正常に生育してきた形質転換体のコロニーを釣上げ、これをM9寒天培地に画線培養したところ生育が認められ、予想どおりこれら形質転換株においてASDをコードする遺伝子が機能していることを確認した。

M9培地で出現した形質転換体3株よりプラスミドを抽出し、それらプラスミドの中に挿入断片の存在を確認した。各々のプラスミドをpMMASD-1、pMMASD-2、pMMASD-3と命名した。これらのプラスミドを用いて再度E. coli Hfr3000 U482を形質転換したところ、各形質転換体はM9最少培地にて生育した。さらに各形質転換体を20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL培地にて一晩培養し、培養液を遠心分離にて集菌後、超音波破碎にて粗酵素液を調製し、Boyらの方法 (Journal of Bacteriology, vol.112(1), 84-92(1972)) に準じてASD活性を測定した (図4、pMMASD-1、pMMASD-2、pMMASD-3)。なお、コントロール実験についてはベクターを保持する宿主を、20 μ g/mlのジアミノピメリン酸及び20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL培地にて同様に培養しASD活性を測定した (図4、Vector)。その結果、ベクターのみを保持する形質転換体には酵素活性を検出できなかったのに対して、挿入断片を有する3つのクローンにはASD活性を検出することができ

たので、取得した遺伝子はメチロフィラス・メチロトロファス由来のASDをコードする遺伝子 (asdと命名) であることが判明した。

asd遺伝子のDNA塩基配列はダイデオキシ法にて決定した。そして得られた3つのクローンは全て共通の断片を含んでいることがわかった。メチロフィラス・メチロトロファス由来asd遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を、配列番号7に示した。また、同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号7及び8に示す。

(3) ジヒドロジピコリン酸合成酵素 (DDPS) をコードする遺伝子のクローニング

dapA遺伝子を欠損した*E. coli* AT997 (CGSC 4547株) を、上記と同じエレクトロポレーション法で遺伝子ライブラリー液Aを用いて形質転換した。形質転換液に、20 μ g/ml のジアミノピメリン酸を含むSOC培地を添加し、37°Cにて振盪培養後、培養液を20 μ g/ml のジアミノピメリン酸及び100 μ g/ml のアンピシリンを含むL培地に塗布しコロニーを出現させた。これをマスタープレートとして100 μ g/ml のアンピシリンを含むM9最少寒天培地へのレプリカを行い37°Cにて2~3日間保温した。宿主はdapA遺伝子を欠損しているために、ジアミノピメリン酸を含んでいないM9最少培地において生育できないのに対し、メチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPSをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能となる。

M9培地で出現したコロニー2株よりプラスミドを抽出し調べたところ、プラスミド中に挿入断片の存在を確認した。各々のプラスミドをpMMDAPA-1、pMMDAPA-2と命名した。これらのプラスミドを用いて*E. coli* AT997をあらためて形質転換したところ、各形質転換体はM9最少培地にて生育した。さらにこれらのプラスミドを含む形質転換体を100 μ g/ml のアンピシリンを含むL培地にて一夜培養し、培養液を遠心分離にて集菌後、超音波破碎にて細胞抽出液を調製し、Yugariらの方法 (Journal of Biological Chemistry, vol.240, p.4710(1965)) に従いDDPS活性を測定した (図5、pMMDAPA-1、pMMDAPA-2)。なお、コントロール実験についてはベクターを保持する宿主を20 μ g/ml のジアミノピメリン酸及び100 μ g/ml のアンピシリンを含むL培地にて同様に培養し、DDPS活性を測定した (図5、Vecto

r)。その結果、ベクターのみを保持する形質転換体には酵素活性を検出できなかったのに対して、挿入断片を有するプラスミドをもつ各形質転換体にはDDPS活性を検出することができたので、取得した遺伝子はメチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPSをコードする遺伝子(dapAと命名)であることが判明した。

dapA遺伝子のDNA塩基配列はダイデオキシ法にて決定した。2つの挿入断片中には共通するDNA断片を含んでいることがわかった。メチロフィラス・メチロトロファス由来dapA遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を、配列番号9に示した。また、同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号9及び10に示す。

(4) ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ(DDPR)をコードする遺伝子のクローニング

dapB遺伝子を欠損したE. coli AT999 (CGSC 4549株)を、上記と同じエレクトロポレーション法で遺伝子ライブラリー液Aを用いて形質転換した。形質転換液に、20 μ g/mlのジアミノピメリン酸を含むSOC培地を添加し、37°Cにて振盪培養後、遠心分離にて集菌した。菌体をL培地に懸濁後、遠心分離にて洗浄を行った。同様の洗浄操作をもう一度繰り返しL培地に懸濁後、100 μ g/mlのアンピシリンを含むL寒天培地に培養液を塗布し、37°C一晩保温した。宿主はdapB遺伝子を欠損しているためにジアミノピメリン酸を含んでいないL培地では生育が非常に遅い。メチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPRをコードする遺伝子をもつプラスミドを保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりL培地においても正常な生育が観察される。さらにM9最少培地において宿主E. coliは生育できないのに対し、メチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPR遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能となる。

L培地で正常に生育してきた形質転換体をM9寒天培地に画線培養したところ、M9培地上でも生育してきた。こうしてこのDDPRをコードする遺伝子が機能していることを確認した。M9培地で出現したコロニーよりプラスミドを抽出し調べたところ、プラスミド中に挿入断片の存在を確認した。当該プラスミド(pMMDAPB)を用いて、再度E. coli AT999を形質転換したところ、当該形質転換体はM9最少培地にて生育した。さらに当該プラスミドを含む形質転換体をL培地にて一夜培養し、培養液を遠心分離にて集菌後、超音波破碎にて細胞抽出液を調製し、Tami

rらの方法 (Journal of Biological Chemistry, vol.249, p.3034(1974)) に従いDDPR活性を測定した (図6、pMMDAPB)。なお、コントロール実験については、ベクターを保持する宿主を20 μ g/mlのジアミノピメリン酸及び100 μ g/mlのアンピシリンを含むL培地にて同様に培養し、DDPR活性を測定した (図6、Vector)。その結果、ベクターのみを保持する形質転換体には酵素活性は検出できなかったのに対して、pMMDAPBを有する形質転換体にはDDPR活性を検出することができたので、取得した遺伝子はメチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPRをコードする遺伝子 (dapBと命名) であることが判明した。

dapB遺伝子のDNA塩基配列はダイデオキシ法にて決定した。メチロフィラス・メチロトロファス由来dapB遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を、配列番号11に示した。また、同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号11及び12に示す。

(5) ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素(DPDC)をコードする遺伝子のクローニング

lysA遺伝子を欠損したE. coli AT2453(CGSC 4505株)を、上記と同じエレクトロポレーション法で遺伝子ライブラリー液Aを用いて形質転換した。形質転換液にSOC培地を添加し、37°Cにて振盪培養後、遠心分離し、菌体を5mlの滅菌水に懸濁しさらに遠心分離し洗浄した。この洗浄操作をもう一度繰り返し、菌体を500 μ lの滅菌水に懸濁し、20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むM9最少寒天培地に培養液を塗布し、37°Cにて2~3日間保温した。宿主はlysA遺伝子を欠損しているためにリジンを含んでいないM9最少培地において生育できないのに対し、メチロフィラス・メチロトロファス由来のDPDCをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能となる。

M9培地で出現した形質転換体3株よりプラスミドを抽出し調べたところ、プラスミド中に挿入断片の存在を確認した。各々のプラスミドをpMMLYSA-1、pMMLYSA-2、pMMLYSA-3と命名した。これらのプラスミドを用いてE. coli AT2453をあらためて形質転換したところ、各プラスミドの形質転換体はM9最少培地にて生育した。さらに各当該プラスミドを含む形質転換体を20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL培地にて一夜培養し、培養液を遠心分離にて集菌後、超音波破碎にて細胞抽出液を調製し、Cremerらの方法 (Journal of General Microbiology, vol.

134, 3221-3229(1988))に従いDPDC活性を測定した(図7、pMMLYSA-1、pMMLYSA-2、pMMLYSA-3)。なお、コントロール実験については、ベクターを保持する宿主を20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL培地にて同様に培養しDPDC活性を測定した(図7、Vector)。その結果、ベクターのみを保持する形質転換体には酵素活性は検出できなかったのに対して、挿入断片を有するプラスミドを保持する形質転換体3株からはいずれもDPDC活性を検出することができたので、取得した遺伝子はメチロフィラス・メチロトロファス由来のDPDCをコードする遺伝子(lysAと命名)であることが判明した。

lysA遺伝子のDNA塩基配列はダイデオキシ法にて決定した。3つの挿入断片は全て共通のDNA断片を含んでいることがわかった。メチロフィラス・メチロトロファス由来lysA遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を、配列番号13に示した。また、同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号13及び14に示す。

産業上の利用の可能性

本発明により、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌、同細菌を用いたL-アミノ酸の製造法、及びL-アミノ酸含量が増加したメチロフィラス属細菌菌体が提供される。本発明の方法によれば、メタノールを原料としてL-アミノ酸を製造することが可能となる。また、本発明により、メチロフィラス属細菌の新規なL-リジン生合成酵素遺伝子が提供される。

請求の範囲

1. L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌。
2. L-アミノ酸がL-リジン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン又はL-スレオニンである請求項1記載のメチロフィラス属細菌。
3. L-アミノ酸アナログ耐性又はL-アミノ酸要求性を有する請求項1記載のメチロフィラス属細菌。
4. L-アミノ酸生合成系酵素の活性が増強された請求項1記載のメチロフィラス属細菌。
5. ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強され、L-リジン生産能を有する請求項1記載のメチロフィラス属細菌。
6. ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性が増強され、L-リジン生産能を有する請求項1記載のメチロフィラス属細菌。
7. アスパルトキナーゼ活性が増強され、L-リジン生産能を有する請求項1記載のメチロフィラス属細菌。
8. さらにアスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、及び、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素から選ばれる1種、2種又は3種の酵素の活性が増強された請求項5～7のいずれか一項に記載のメチロフィラス属細菌。
9. L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強された請求項5記載のメチロフィラス属細菌。
10. アスパルトキナーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、ホモセリンキナーゼ及びスレオニンシンターゼの活性が増強され、L-スレオニン生産能を有する請求項1記載のメチロフィラス属細菌。
11. メチロフィラス属細菌がメチロフィラス・メチロトロファスである請求項1～10のいずれか一項に記載の細菌。
12. 請求項1～11のいずれか一項に記載のメチロフィラス属細菌を培地

に培養し、該培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

13. 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする請求項12記載の方法。

14. 請求項1～11のいずれか一項に記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該細菌の菌体中にL-アミノ酸を生産蓄積させることを特徴とする、L-アミノ酸含量が増加したメチロフィラス属細菌菌体の製造法。

15. L-アミノ酸がL-リジン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン又はL-スレオニンである請求項14記載のメチロフィラス属細菌菌体の製造法。

16. 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、アスパルトキナーゼ活性を有するタンパク質。

17. 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項16記載のDNA。

(a) 配列番号5の塩基番号510～1736からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号5の塩基番号510～1736からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アスパルトキナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

18. 下記(C)又は(D)に示すタンパク質をコードするDNA。

(C) 配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素活性を有するタンパク質。

19. 下記(c)又は(d)に示すDNAである請求項18記載のDNA。

(c) 配列番号7の塩基番号98～1207からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列番号7の塩基番号98～1207からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アスパラ

ギン酸セミアルデヒド脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

20. 下記(E)又は(F)に示すタンパク質をコードするDNA。

(E) 配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性を有するタンパク質。

21. 下記(e)又は(f)に示すDNAである請求項20記載のDNA。

(e) 配列番号9の塩基番号1268～2155からなる塩基配列を含むDNA。

(f) 配列番号9の塩基番号1268～2155からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

22. 下記(G)又は(H)に示すタンパク質をコードするDNA。

(G) 配列番号12に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(H) 配列番号12に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性を有するタンパク質。

23. 下記(g)又は(h)に示すDNAである請求項22記載のDNA。

(g) 配列番号11の塩基番号2080～2883からなる塩基配列を含むDNA。

(h) 配列番号11の塩基番号2080～2883からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

24. 下記(I)又は(J)に示すタンパク質をコードするDNA。

(I) 配列番号14に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(J) 配列番号14に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

25. 下記(i)又は(j)に示すDNAである請求項24記載のDNA。

(i) 配列番号13の塩基番号751～1995からなる塩基配列を含むDNA。

(j) 配列番号 13 の塩基番号 751 ～ 1995 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA。



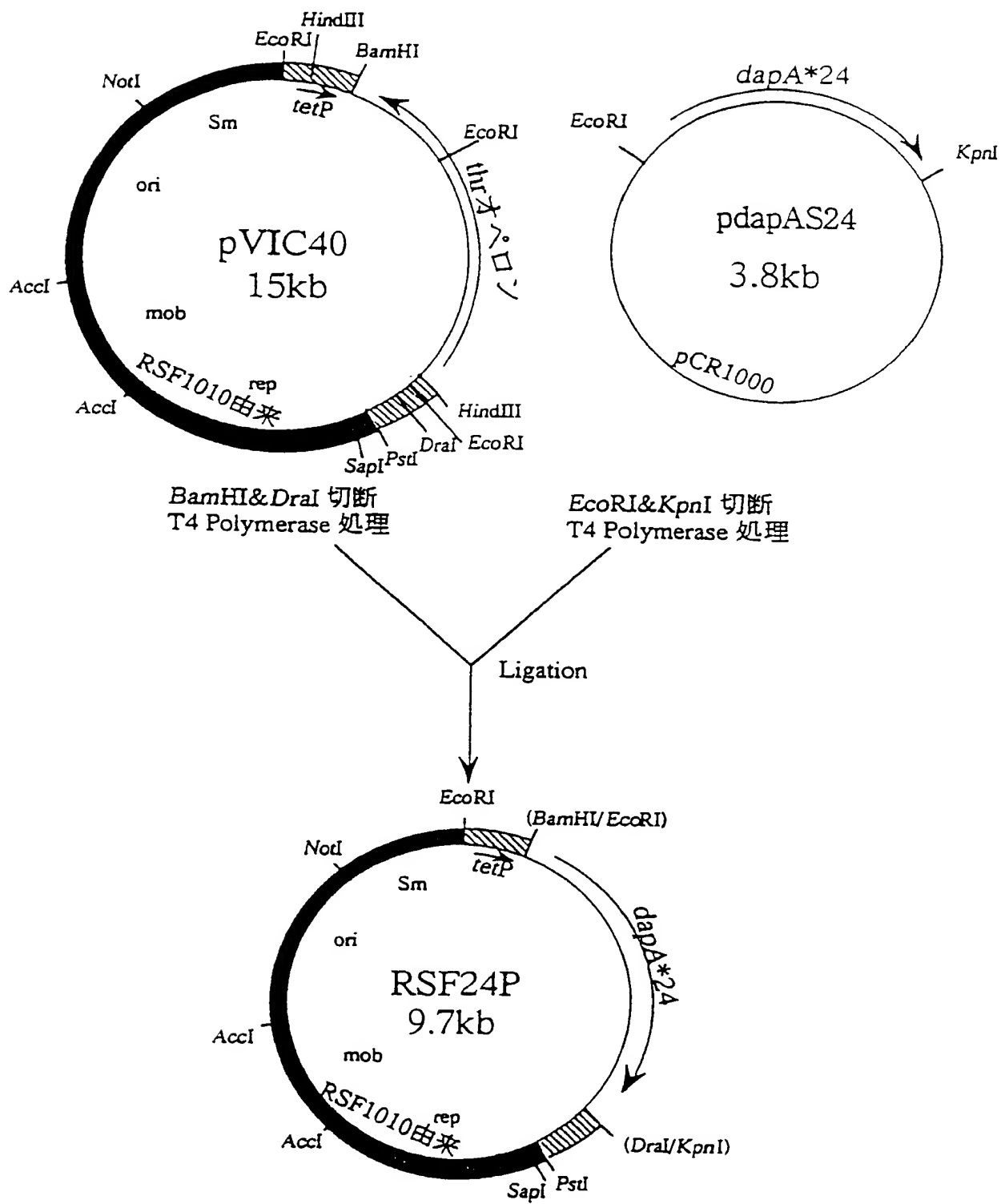


図 1



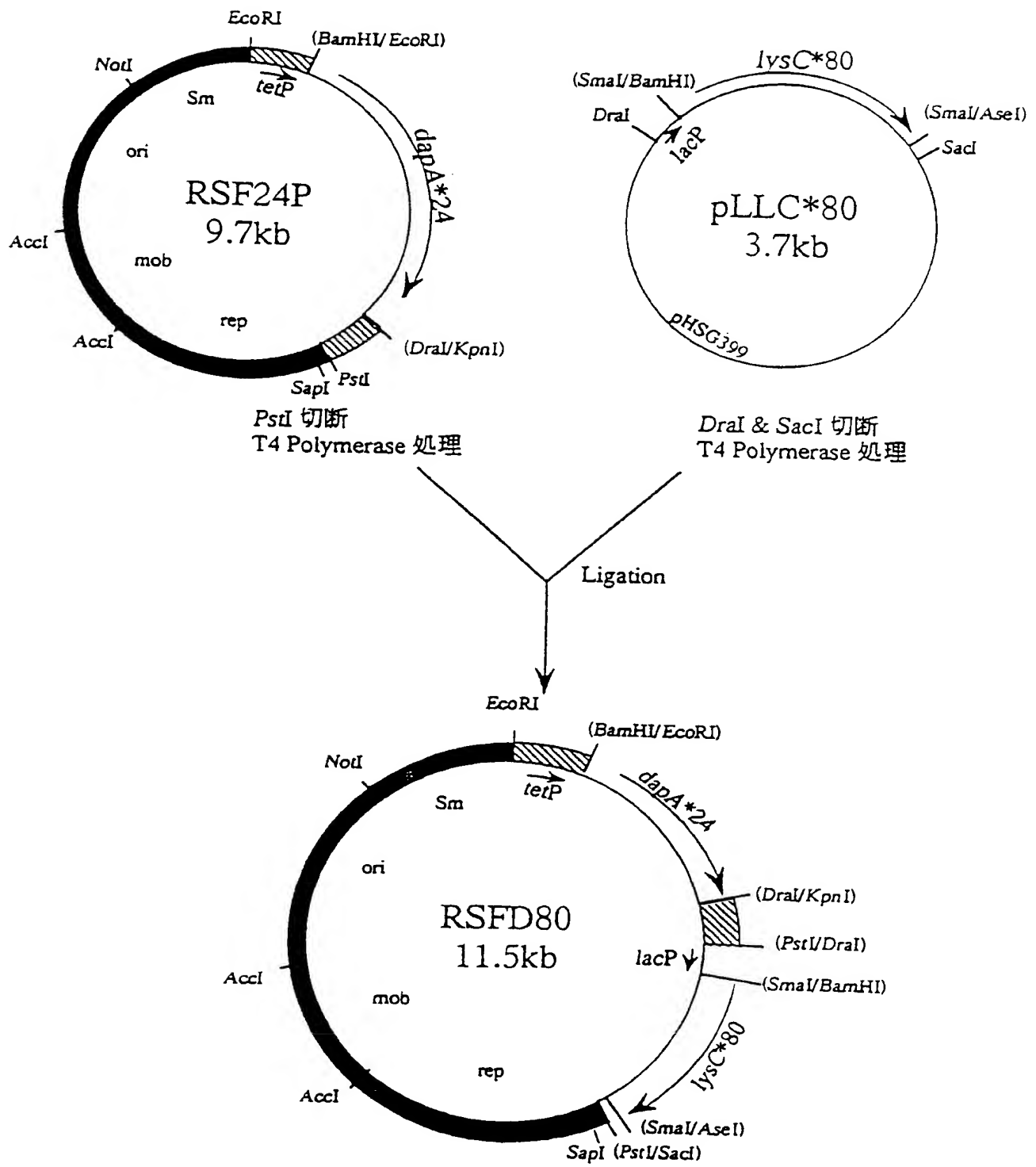


図 2



3/5

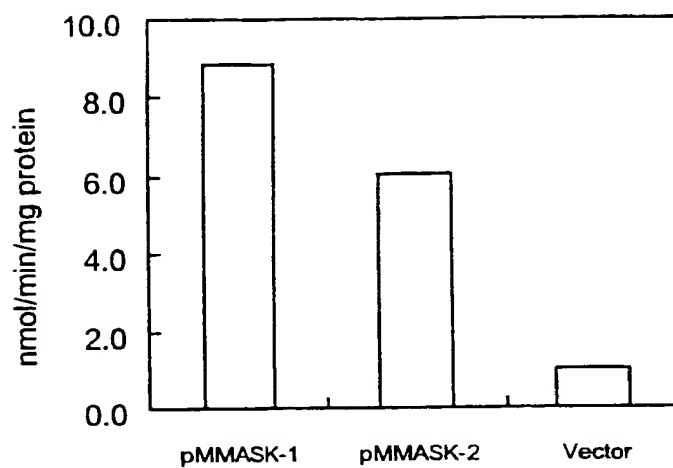


図 3

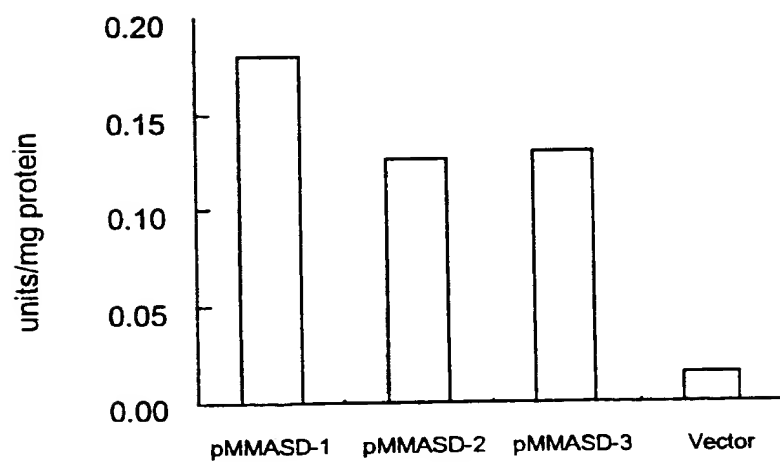


図 4



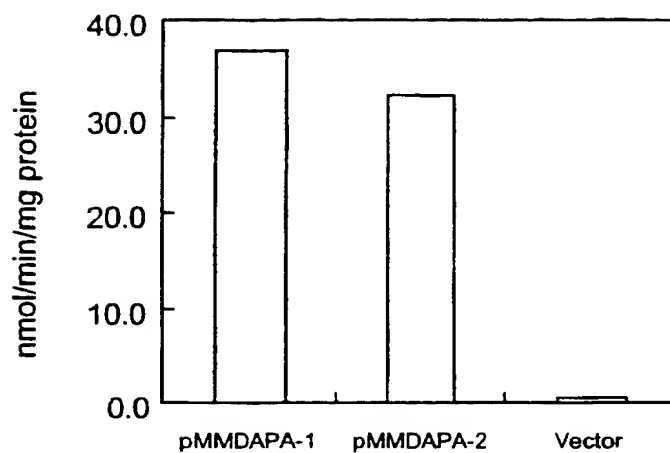


図 5

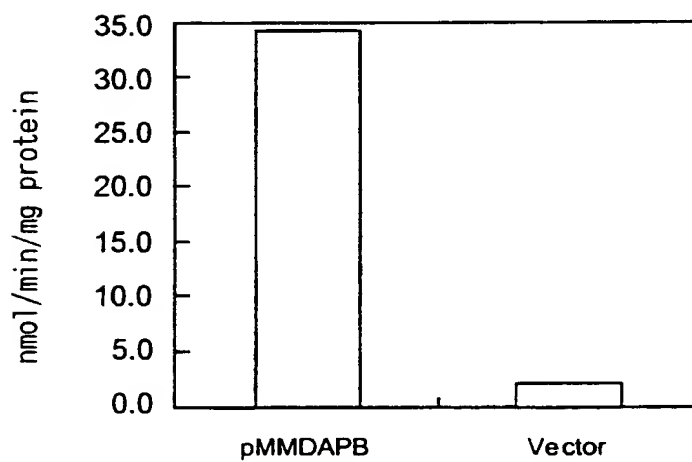


図 6



5/5

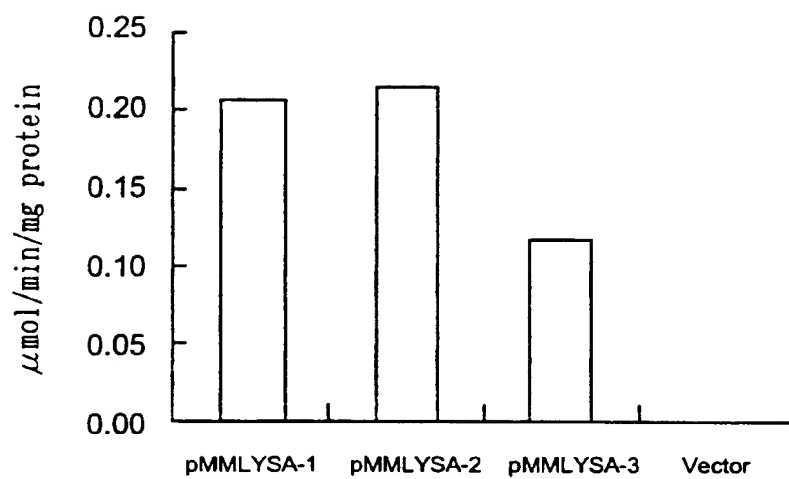


図 7



配列表(SEQUENCE LISTING)

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

<130> B-591MSOP975

<150> JP 11-103143

<151> 1999-04-09

<150> JP 11-169447

<151> 1999-06-16

<150> JP 11-368097

<151> 1999-12-24

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1197

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (272)..(1147)

<400> 1

```
ccaggcgact gtcttcaata ttacagccgc aactactgac atgacgggtg atggtgttca 60
caattccaag gcgatcgga cccaacgcag tgatcaccag ataatgtgtt gcgatgacag 120
tgtcaaaactg gttattcctt taaggggtga gttgttctta aggaaagcat aaaaaaaaca 180
tgcatacaac aatcagaacg gttctgtctg cttgctttta atgccatacc aaacgtacca 240
ttgagacact tgtttgcaca gaggatggcc c atg ttc acg gga agt att gtc 292
```

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val



gcg att gtt act ccg atg gat gaa aaa ggt aat gtc tgt cgg gct agc	340
Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser	
10 15 20	
ttg aaa aaa ctg att gat tat cat gtc gcc agc ggt act tcg gcg atc	388
Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile	
25 30 35	
gtt tct gtt ggc acc act ggc gag tcc gct acc tta aat cat gac gaa	436
Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser Ala Thr Leu Asn His Asp Glu	
40 45 50 55	
cat gct gat gtg gtg atg atg acg ctg gat ctg gct gat ggg cgc att	484
His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile	
60 65 70	
ccg gta att gcc ggg acc ggc gct aac gct act gcg gaa gcc att agc	532
Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser	
75 80 85	
ctg acg cag cgc ttc aat gac agt ggt atc gtc ggc tgc ctg acg gta	580
Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly Ile Val Gly Cys Leu Thr Val	
90 95 100	
acc cct tac tac aat cgt ccg tcg caa gaa ggt ttg tat cag cat ttc	628
Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe	
105 110 115	
aaa gcc atc gct gag cat act gac ctg ccg caa att ctg tat aat gtg	676
Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val	
120 125 130 135	
ccg tcc cgt act ggc tgc gat ctg ctc ccg gaa acg gtg ggc cgt ctg	724
Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu	
140 145 150	
gcg aaa gta aaa aat att atc gga atc aaa gag gca aca ggg aac tta	772
Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu	
155 160 165	
acg cgt gta aac cag atc aaa gag ctg gtt tca gat gat ttt gtt ctg	820
Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu Val Ser Asp Asp Phe Val Leu	
170 175 180	
ctg agc ggc gat gat gcg agc gcg ctg gac ttc atg caa ttg ggc ggt	868
Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly	
185 190 195	
cat ggg gtt att tcc gtt acg act aac gtc gca gcg cgt gat atg gcc	916
His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn Val Ala Ala Arg Asp Met Ala	



3/31

200	205	210	215	
cag atg tgc aaa ctg gca gca gaa gaa cat ttt gcc gag gca cgc gtt				964
Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu His Phe Ala Glu Ala Arg Val				
	220	225	230	
att aat cag cgt ctg atg cca tta cac aac aaa cta ttt gtc gaa ccc				1012
Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro				
	235	240	245	
aat cca atc ccg gtg aaa tgg gca tgt aag gaa ctg ggt ctt gtg gcg				1060
Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala				
	250	255	260	
acc gat acg ctg cgc ctg cca atg aca cca atc acc gac agt ggt cgt				1108
Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg				
	265	270	275	
gag acg gtc aga gcg gcg ctt aag cat gcc ggt ttg ctg taaagtttag				1157
Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His Ala Gly Leu Leu				
280	285	290		
ggagatttga tggcttactc tgttcaaaag tcgcgcctgg				1197

<210> 2

<211> 292

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys			
1	5	10	15
Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val			
	20	25	30
Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser			
	35	40	45
Ala Thr Leu Asn His Asp Glu His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu			
	50	55	60
Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn			
	65	70	75
Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly			
	85	90	95
Ile Val Gly Cys Leu Thr Val Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln			
	100	105	110



4/31

Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu
 115 120 125
 Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu
 130 135 140
 Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile
 145 150 155 160
 Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu
 165 170 175
 Val Ser Asp Asp Phe Val Leu Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu
 180 185 190
 Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn
 195 200 205
 Val Ala Ala Arg Asp Met Ala Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu
 210 215 220
 His Phe Ala Glu Ala Arg Val Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His
 225 230 235 240
 Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys
 245 250 255
 Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr
 260 265 270
 Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His
 275 280 285
 Ala Gly Leu Leu
 290

<210> 3

<211> 2147

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (584)..(1930)

<400> 3

tcgaagtgtt tctgtagtgc ctgccaggca gcggtctgcg ttggattgat gtttttcatt 60
 agcaatactc ttctgatttt gagaattgtg actttggaag attgtagcgc cagtcacaga 120
 aaaatgtgat ggtttttagtg ccgtttagcgt aatgtttgagt gtaaaccctt agcgcagtga 180



agcatttatt agctgaacta ctgaccgcca ggagtggatg aaaaatccgc atgaccccat 240
 cgttgacaac cgccccgctc accctttatt tataaatgta ctacctgcgc tagcgcaggc 300
 cagaagaggc gcgttgccca agtaacgggtg ttggaggagc cagtcctgtg ataacacctg 360
 aggggggtgca tcgccgagggt gattgaacgg ctggccacgt tcatcatcgg ctaagggggc 420
 tgaateccct gggttgtcac cagaagcgtt cgcagtcggg cgtttcgcaa gtggtggagc 480
 acttctgggt gaaaatagta gcgaagtatc gctctgcgcc caccgctctt ccgctcttcc 540
 cttgtgccaa ggctgaaaat ggatccctg acacgaggta gtt atg tct gaa att 595
 Met Ser Glu Ile
 1
 gtt gtc tcc aaa ttt ggc ggt acc agc gta gct gat ttt gac gcc atg 643
 Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp Phe Asp Ala Met
 5 10 15 20
 aac cgc agc gct gat att gtg ctt tct gat gcc aac gtg cgt tta gtt 691
 Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn Val Arg Leu Val
 25 30 35
 gtc ctc tcg gct tct gct ggt atc act aat ctg ctg gtc gct tta gct 739
 Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu Val Ala Leu Ala
 40 45 50
 gaa gga ctg gaa cct ggc gag cga ttc gaa aaa ctc gac gct atc cgc 787
 Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu Asp Ala Ile Arg
 55 60 65
 aac atc cag ttt gcc att ctg gaa cgt ctg cgt tac ccg aac gtt atc 835
 Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr Pro Asn Val Ile
 70 75 80
 cgt gaa gag att gaa cgt ctg ctg gag aac att act gtt ctg gca gaa 883
 Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr Val Leu Ala Glu
 85 90 95 100
 gcg gcg gcg ctg gca acg tct ccg gcg ctg aca gat gag ctg gtc agc 931
 Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp Glu Leu Val Ser
 105 110 115
 cac ggc gag ctg atg tcg acc ctg ctg ttt gtt gag atc ctg cgc gaa 979
 His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu Ile Leu Arg Glu
 120 125 130
 cgc gat gtt cag gca cag tgg ttt gat gta cgt aaa gtg atg cgt acc 1027
 Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys Val Met Arg Thr
 135 140 145
 aac gac cga ttt ggt cgt gca gag cca gat ata gcc gcg ctg gcg gaa 1075
 Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala Ala Leu Ala Glu



6/31

150	155	160	
ctg gcc gcg ctg cag ctg ctc cca cgt ctc aat gaa ggc tta gtg atc			1123
Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu Gly Leu Val Ile			
165	170	175	180
acc cag gga ttt atc ggt agc gaa aat aaa ggt cgt aca acg acg ctt			1171
Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg Thr Thr Thr Leu			
	185	190	195
ggc cgt gga ggc agc gat tat acg gca gcc ttg ctg gcg gag gct tta			1219
Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Leu			
	200	205	210
cac gca tct cgt gtt gat atc tgg acc gac gtc ccg ggc atc tac acc			1267
His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro Gly Ile Tyr Thr			
	215	220	225
acc gat cca cgc gta gtt tcc gca gca aaa cgc att gat gaa atc gcg			1315
Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile Asp Glu Ile Ala			
	230	235	240
ttt gcc gaa gcg gca gag atg gca act ttt ggt gca aaa gta ctg cat			1363
Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala Lys Val Leu His			
245	250	255	260
ccg gca acg ttg cta ccc gca gta cgc agc gat atc ccg gtc ttt gtc			1411
Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile Pro Val Phe Val			
	265	270	275
ggc tcc agc aaa gac cca cgc gca ggt ggt acg ctg gtg tgc aat aaa			1459
Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu Val Cys Asn Lys			
	280	285	290
act gaa aat ccg ccg ctg ttc cgc gct ctg gcg ctt cgt cgc aat cag			1507
Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu Arg Arg Asn Gln			
	295	300	305
act ctg ctc act ttg cac agc ctg aat atg ctg cat tct cgc ggt ttc			1555
Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His Ser Arg Gly Phe			
	310	315	320
ctc gcg gaa gtt ttc ggc atc ctc gcg cgg cat aat att tcg gta gac			1603
Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn Ile Ser Val Asp			
325	330	335	340
tta atc acc acg tca gaa gtg agc gtg gca tta acc ctt gat acc acc			1651
Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr Leu Asp Thr Thr			
	345	350	355
ggt tca acc tcc act ggc gat acg ttg ctg acg caa tct ctg ctg atg			1699



7/31

Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln Ser Leu Leu Met
 360 365 370
 gag ctt tcc gca ctg tgt cgg gtg gag gtg gaa gaa ggt ctg gcg ctg 1747
 Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu Gly Leu Ala Leu
 375 380 385
 gtc gcg ttg att ggc aat gac ctg tca aaa gcc tgc ggc gtt ggc aaa 1795
 Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys Gly Val Gly Lys
 390 395 400
 gag gta ttc ggc gta ctg gaa ccg ttc aac att cgc atg att tgt tat 1843
 Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg Met Ile Cys Tyr
 405 410 415 420
 ggc gca tcc agc cat aac ctg tgc ttc ctg gtg ccc ggc gaa gat gcc 1891
 Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro Gly Glu Asp Ala
 425 430 435
 gag cag gtg gtg caa aaa ctg cat agt aat ttg ttt gag taaatactgt 1940
 Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe Glu
 440 445
 atggcctgga agctatatatt cgggccgtat tgattttctt gtcactatgc tcatcaataa 2000
 acgagcctgt actctgttaa ccagcgtctt tatcgagaaa taattgcctt taattttttt 2060
 atctgcatct ctaattaatt atcgaaagag ataaatagtt aagagaaggc aaaatgaata 2120
 ttatcagttc tgctcgcaaa ggaattc 2147

<210> 4

<211> 449

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp
 1 5 10 15
 Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
 20 25 30
 Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu
 35 40 45
 Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu
 50 55 60
 Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr
 65 70 75 80



8/31

Pro Asn Val Ile Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr
 85 90 95
 Val Leu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp
 100 105 110
 Glu Leu Val Ser His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu
 115 120 125
 Ile Leu Arg Glu Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys
 130 135 140
 Val Met Arg Thr Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu
 165 170 175
 Gly Leu Val Ile Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg
 180 185 190
 Thr Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu
 195 200 205
 Ala Glu Ala Leu His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro
 210 215 220
 Gly Ile Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile
 225 230 235 240
 Asp Glu Ile Ala Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala
 245 250 255
 Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile
 260 265 270
 Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu
 275 280 285
 Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
 290 295 300
 Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
 305 310 315 320
 Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
 325 330 335
 Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350
 Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365
 Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380



9/31

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400
 Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415
 Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430
 Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445
 Glu

<210> 5

<211> 1981

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<221> CDS

<222> (510)..(1736)

<400> 5

gttaaacgcg gccagtgaat ttgactcggt cccctgcctg gcaaaatcgc acaggatgatg 60
 gacaacgtga aatcgcttga aaaagaattg gcacgcctca agtccaagct ggcctcctca 120
 caggggggatg acctcgcgac gcaagcgcag gacgtcaacg gcgccaaagt actggcagcc 180
 acctcgacg gggcgcatgc caatgccttg cgtgaaacca tggataagct caaagataaa 240
 ctcaaatctg cagtcattgt gctggcgagc gtggctgacg gtaaagtcag cctggctgcg 300
 ggtgtcacta ctgacttgac tggcaaggtc aaagcaggcg aagtttgtca atcatgtggc 360
 tggtcaggtc ggtggcaaag gtggtggtaa accggatatg gcgatggcag gtggtactga 420
 gcccgcta at ttgccgcagg ctttggcaag tgtgaaggct tgggtagaaa caaaactaaa 480
 ttaattta at tgattaacag agcgaaata atg gca tta atc gta caa aaa tat 533
 Met Ala Leu Ile Val Gln Lys Tyr
 1 5
 ggt ggt acc tcg gtg gct aat ccc gag cgt atc cgt aat gtg gcg cgt 581
 Gly Gly Thr Ser Val Ala Asn Pro Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Arg
 10 15 20
 cgc gtg gcg cgt tac aag gca ttg ggc cac cag gtg gtg gtt gtg gta 629
 Arg Val Ala Arg Tyr Lys Ala Leu Gly His Gln Val Val Val Val Val
 25 30 35 40



10/31

tcc gca atg tct ggt gaa acc aac cgg ttg atc tca ctg gcc aag gaa	677
Ser Ala Met Ser Gly Glu Thr Asn Arg Leu Ile Ser Leu Ala Lys Glu	
45 50 55	
atc atg caa gac cct gat cca cgt gag ctg gat gtg atg gta tca acc	725
Ile Met Gln Asp Pro Asp Pro Arg Glu Leu Asp Val Met Val Ser Thr	
60 65 70	
ggt gag cag gtc acc atc ggc atg acg gcc ctg gca ctg atg gag ctt	773
Gly Glu Gln Val Thr Ile Gly Met Thr Ala Leu Ala Leu Met Glu Leu	
75 80 85	
ggc att aag gca aaa agc tat acc ggt acc cag gtt aag atc ttg act	821
Gly Ile Lys Ala Lys Ser Tyr Thr Gly Thr Gln Val Lys Ile Leu Thr	
90 95 100	
gac gat gct ttt acc aag gca cgt att ctg gat atc gac gaa cat aac	869
Asp Asp Ala Phe Thr Lys Ala Arg Ile Leu Asp Ile Asp Glu His Asn	
105 110 115 120	
ctg aaa aaa gac ctg gat gat ggc tat gtc tgc gtg gtg gct ggg ttc	917
Leu Lys Lys Asp Leu Asp Asp Gly Tyr Val Cys Val Val Ala Gly Phe	
125 130 135	
cag ggc gtg gat gcc aat ggc aat att acg acc ttg ggc cgt ggc ggc	965
Gln Gly Val Asp Ala Asn Gly Asn Ile Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly	
140 145 150	
tca gat act act ggt gta gca ctg gct gcg gcg tta aag gcg gat gaa	1013
Ser Asp Thr Thr Gly Val Ala Leu Ala Ala Ala Leu Lys Ala Asp Glu	
155 160 165	
tgt cag att tat acc gat gtc gat ggc gtt tac acc acc gat ccg cgt	1061
Cys Gln Ile Tyr Thr Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Thr Asp Pro Arg	
170 175 180	
gtg gtg cct gag gca cgc cgc ttg gat aaa att acc ttt gaa gaa atg	1109
Val Val Pro Glu Ala Arg Arg Leu Asp Lys Ile Thr Phe Glu Glu Met	
185 190 195 200	
ttg gaa ctg gct tca cag ggc tcc aaa gta ttg caa att cgc tcg gtt	1157
Leu Glu Leu Ala Ser Gln Gly Ser Lys Val Leu Gln Ile Arg Ser Val	
205 210 215	
gag ttt gcc ggt aaa tac aaa gtc aaa tta cgt gtg ctg tcc agc ttc	1205
Glu Phe Ala Gly Lys Tyr Lys Val Lys Leu Arg Val Leu Ser Ser Phe	
220 225 230	
gaa gag gag ggc gac ggt aca ctg atc aca ttc gaa gaa aat gag gaa	1253
Glu Glu Glu Gly Asp Gly Thr Leu Ile Thr Phe Glu Glu Asn Glu Glu	



11/31

235	240	245	
aac atg gaa gaa cca att atc tcc ggc atc gcc ttt aac cgc gat gag			1301
Asn Met Glu Glu Pro Ile Ile Ser Gly Ile Ala Phe Asn Arg Asp Glu			
250	255	260	
gcg aaa att acc gtg acg ggc gtg ccc gac aaa cca gga att gcc tat			1349
Ala Lys Ile Thr Val Thr Gly Val Pro Asp Lys Pro Gly Ile Ala Tyr			
265	270	275	280
cag att ttg ggc ccg gtg gca gac gcc aat att gat gtg gat atg att			1397
Gln Ile Leu Gly Pro Val Ala Asp Ala Asn Ile Asp Val Asp Met Ile			
285	290	295	
atc cag aac gtc ggt gcg gat ggt acg act gac ttc acc ttt acc gta			1445
Ile Gln Asn Val Gly Ala Asp Gly Thr Thr Asp Phe Thr Phe Thr Val			
300	305	310	
cat aaa aat gag atg aac aaa gcc ctg agc att ctt aga gat aaa gtg			1493
His Lys Asn Glu Met Asn Lys Ala Leu Ser Ile Leu Arg Asp Lys Val			
315	320	325	
cag ggc cat atc cag gca cgt gaa atc agc ggc gac gac aag att gcc			1541
Gln Gly His Ile Gln Ala Arg Glu Ile Ser Gly Asp Asp Lys Ile Ala			
330	335	340	
aaa gtc tct gtg gtt ggg gtg ggt atg cgc tca cat gta ggg atc gcc			1589
Lys Val Ser Val Val Gly Val Gly Met Arg Ser His Val Gly Ile Ala			
345	350	355	360
agc cag atg ttc cgt acg ctg gcc gaa gaa ggg atc aat att caa atg			1637
Ser Gln Met Phe Arg Thr Leu Ala Glu Glu Gly Ile Asn Ile Gln Met			
365	370	375	
atc tca acc agc gaa att aaa att gca gtc gtg atc gaa gag aag tac			1685
Ile Ser Thr Ser Glu Ile Lys Ile Ala Val Val Ile Glu Glu Lys Tyr			
380	385	390	
atg gaa ctg gct gta cgc gtg ttg cat aaa gca ttc ggc ctc gaa aac			1733
Met Glu Leu Ala Val Arg Val Leu His Lys Ala Phe Gly Leu Glu Asn			
395	400	405	
gca taatcgccaa cggacgaata aagaaataaa acattcttct tttttgcgtt			1786
Ala			
gatttttgaa gggttttcac gtagtatggc agcccttcga tgcagtagca atgctgcaaa			1846
gagaacagca tgccgctgtg ttggtactat taaaacttca ttgttttaat aaggtgaggg			1906
ggatectcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggcc gtaatccatg gtcatagctg			1966
tttcttggtg tgaaa			1981



12/31

<210> 6

<211> 409

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 6

Met	Ala	Leu	Ile	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gly	Thr	Ser	Val	Ala	Asn	Pro
1				5				10						15	
Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Val	Ala	Arg	Arg	Val	Ala	Arg	Tyr	Lys	Ala	Leu
			20					25					30		
Gly	His	Gln	Val	Val	Val	Val	Val	Ser	Ala	Met	Ser	Gly	Glu	Thr	Asn
		35					40					45			
Arg	Leu	Ile	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Ile	Met	Gln	Asp	Pro	Asp	Pro	Arg
	50					55				60					
Glu	Leu	Asp	Val	Met	Val	Ser	Thr	Gly	Glu	Gln	Val	Thr	Ile	Gly	Met
65				70					75					80	
Thr	Ala	Leu	Ala	Leu	Met	Glu	Leu	Gly	Ile	Lys	Ala	Lys	Ser	Tyr	Thr
				85				90						95	
Gly	Thr	Gln	Val	Lys	Ile	Leu	Thr	Asp	Asp	Ala	Phe	Thr	Lys	Ala	Arg
		100						105					110		
Ile	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	His	Asn	Leu	Lys	Lys	Asp	Leu	Asp	Asp	Gly
	115						120					125			
Tyr	Val	Cys	Val	Val	Ala	Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asp	Ala	Asn	Gly	Asn
	130					135					140				
Ile	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Gly	Val	Ala	Leu
145				150					155					160	
Ala	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Asp	Glu	Cys	Gln	Ile	Tyr	Thr	Asp	Val	Asp
				165				170					175		
Gly	Val	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Arg	Val	Val	Pro	Glu	Ala	Arg	Arg	Leu
		180					185						190		
Asp	Lys	Ile	Thr	Phe	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ser	Gln	Gly	Ser
	195						200					205			
Lys	Val	Leu	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Glu	Phe	Ala	Gly	Lys	Tyr	Lys	Val
	210					215					220				
Lys	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Ser	Phe	Glu	Glu	Glu	Gly	Asp	Gly	Thr	Leu
225				230					235					240	
Ile	Thr	Phe	Glu	Glu	Asn	Glu	Glu	Asn	Met	Glu	Glu	Pro	Ile	Ile	Ser
			245					250					255		



13/31

Gly Ile Ala Phe Asn Arg Asp Glu Ala Lys Ile Thr Val Thr Gly Val
 260 265 270
 Pro Asp Lys Pro Gly Ile Ala Tyr Gln Ile Leu Gly Pro Val Ala Asp
 275 280 285
 Ala Asn Ile Asp Val Asp Met Ile Ile Gln Asn Val Gly Ala Asp Gly
 290 295 300
 Thr Thr Asp Phe Thr Phe Thr Val His Lys Asn Glu Met Asn Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Ser Ile Leu Arg Asp Lys Val Gln Gly His Ile Gln Ala Arg Glu
 325 330 335
 Ile Ser Gly Asp Asp Lys Ile Ala Lys Val Ser Val Val Gly Val Gly
 340 345 350
 Met Arg Ser His Val Gly Ile Ala Ser Gln Met Phe Arg Thr Leu Ala
 355 360 365
 Glu Glu Gly Ile Asn Ile Gln Met Ile Ser Thr Ser Glu Ile Lys Ile
 370 375 380
 Ala Val Val Ile Glu Glu Lys Tyr Met Glu Leu Ala Val Arg Val Leu
 385 390 395 400
 His Lys Ala Phe Gly Leu Glu Asn Ala
 405

<210> 7

<211> 1452

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<221> CDS

<222> (98)..(1207)

<400> 7

gcatgccgc aggtcgactc tagaggatcc cctgttcaa aaatcttcca aataatcact 60
 gtaatgccgg gttgtccggc tgaaatatcg agtcact atg tta aaa gta ggg ttt 115
 Met Leu Lys Val Gly Phe
 1 5
 gta ggc tgg cgt ggc atg gtt gga tcc gtg cta atg cag cgc atg atg 163
 Val Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val Leu Met Gln Arg Met Met
 10 15 20



cag gaa aac gat ttt gcg gat att gaa ccg caa ttc ttt acg acc tca 211
 Gln Glu Asn Asp Phe Ala Asp Ile Glu Pro Gln Phe Phe Thr Thr Ser
 25 30 35
 caa acg gga ggg gct gcg cct aaa gtt gga aaa gat act cct gcg ctg 259
 Gln Thr Gly Gly Ala Ala Pro Lys Val Gly Lys Asp Thr Pro Ala Leu
 40 45 50
 aaa gat gcc aag gat att gat gct ttg cgc cag atg gat gtg att gtg 307
 Lys Asp Ala Lys Asp Ile Asp Ala Leu Arg Gln Met Asp Val Ile Val
 55 60 65 70
 acc tgc cag ggt ggc gat tac acg agt gac gtc ttc cca caa ttg cgc 355
 Thr Cys Gln Gly Gly Asp Tyr Thr Ser Asp Val Phe Pro Gln Leu Arg
 75 80 85
 gca acc ggc tgg agc ggc cac tgg att gac gcg gcc tct acc tta cgc 403
 Ala Thr Gly Trp Ser Gly His Trp Ile Asp Ala Ala Ser Thr Leu Arg
 90 95 100
 atg gaa aaa gac tcc gtg atc att tta gac ccg gtg aac atg cat gtg 451
 Met Glu Lys Asp Ser Val Ile Ile Leu Asp Pro Val Asn Met His Val
 105 110 115
 att aaa gat gca ttg tcc aat ggc ggc aaa aac tgg atc ggc ggc aac 499
 Ile Lys Asp Ala Leu Ser Asn Gly Gly Lys Asn Trp Ile Gly Gly Asn
 120 125 130
 tgt acc gtc tca ctt atg ttg atg gcg ctg aat ggc ctg ttt aag gct 547
 Cys Thr Val Ser Leu Met Leu Met Ala Leu Asn Gly Leu Phe Lys Ala
 135 140 145 150
 gac ctg gtc gag tgg gcc act tcc atg acc tac cag gcg gct tca ggc 595
 Asp Leu Val Glu Trp Ala Thr Ser Met Thr Tyr Gln Ala Ala Ser Gly
 155 160 165
 gca ggc gcg cag aat atg cgt gaa ctg att agc cag atg ggc gta gtg 643
 Ala Gly Ala Gln Asn Met Arg Glu Leu Ile Ser Gln Met Gly Val Val
 170 175 180
 aat gcc tcc gtg gct gat ttg ctg gcg gat cca gct tct gcc att ttg 691
 Asn Ala Ser Val Ala Asp Leu Leu Ala Asp Pro Ala Ser Ala Ile Leu
 185 190 195
 cag atc gat aaa aca gtg gcg gat acc atc cgt agc gaa gag ttg cct 739
 Gln Ile Asp Lys Thr Val Ala Asp Thr Ile Arg Ser Glu Glu Leu Pro
 200 205 210
 aaa tct aac ttt ggt gtg cca ttg gcg ggc agt ctg atc cca tgg atc 787
 Lys Ser Asn Phe Gly Val Pro Leu Ala Gly Ser Leu Ile Pro Trp Ile



215	220	225	230	
gac aag gac tta ggg aat ggt caa agt aaa gaa gaa tgg aag ggc ggc				835
Asp Lys Asp Leu Gly Asn Gly Gln Ser Lys Glu Glu Trp Lys Gly Gly				
	235	240	245	
gta nag acc aat aag att tta ggt cgt gaa gcg aac ccg att gtg att				883
Val Xaa Thr Asn Lys Ile Leu Gly Arg Glu Ala Asn Pro Ile Val Ile				
	250	255	260	
gac ggt ttg tgt gta cgt atc ggc gcc atg cgt tgc cat tca caa gcg				931
Asp Gly Leu Cys Val Arg Ile Gly Ala Met Arg Cys His Ser Gln Ala				
	265	270	275	
ttg act atc aag ctg cgc aag gat gtg ccg ctg gat gaa atc aat cag				979
Leu Thr Ile Lys Leu Arg Lys Asp Val Pro Leu Asp Glu Ile Asn Gln				
	280	285	290	
atg ctg gct gaa gcg aac gac tgg gct aaa gtc att ccc aat gag cgt				1027
Met Leu Ala Glu Ala Asn Asp Trp Ala Lys Val Ile Pro Asn Glu Arg				
	295	300	305	310
gag gtc agt atg cgg gaa ctc acc ccg gca gcg att acc ggc agt ctg				1075
Glu Val Ser Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala Ile Thr Gly Ser Leu				
	315	320	325	
gcg acg cca gta ggg cgt ttg cgc aaa ctg gcg atg ggt ggt gaa tac				1123
Ala Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Ala Met Gly Gly Glu Tyr				
	330	335	340	
ttg tcg gca ttt acc gta ggt gac cag ttg tta tgg ggc gct gcc gaa				1171
Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu Trp Gly Ala Ala Glu				
	345	350	355	
cct ttg cgc aga atg ttg agg att ctg gtc gaa tct taagtaattg				1217
Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Ile Leu Val Glu Ser				
	360	365	370	
tttaagtagc agcccgtaaa gctatgattt atcaataaaa tcatggtctt ttcgggcttt				1277
tgcttttggt gcaatcctgt ttaatggtta ttgtagcctc aaatcctgta tttattgctc				1337
tcaagccgcc tgggtgcgct tgcgtggctg ggtgaatgat gctattttga caaacgcat				1397
gaattactaa ggggttaatcg gtgagtaaatt ttcaattaaa aaaaatagcc tttgc				1452

<210> 8

<211> 370

<212> PRT

<213> Methylophilus methylotrophus



<400> 8

Met	Leu	Lys	Val	Gly	Phe	Val	Gly	Trp	Arg	Gly	Met	Val	Gly	Ser	Val
1				5				10					15		
Leu	Met	Gln	Arg	Met	Met	Gln	Glu	Asn	Asp	Phe	Ala	Asp	Ile	Glu	Pro
			20					25					30		
Gln	Phe	Phe	Thr	Thr	Ser	Gln	Thr	Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Lys	Val	Gly
		35					40					45			
Lys	Asp	Thr	Pro	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Lys	Asp	Ile	Asp	Ala	Leu	Arg
	50					55					60				
Gln	Met	Asp	Val	Ile	Val	Thr	Cys	Gln	Gly	Gly	Asp	Tyr	Thr	Ser	Asp
65					70					75					80
Val	Phe	Pro	Gln	Leu	Arg	Ala	Thr	Gly	Trp	Ser	Gly	His	Trp	Ile	Asp
				85					90					95	
Ala	Ala	Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Lys	Asp	Ser	Val	Ile	Ile	Leu	Asp
			100					105					110		
Pro	Val	Asn	Met	His	Val	Ile	Lys	Asp	Ala	Leu	Ser	Asn	Gly	Gly	Lys
		115					120					125			
Asn	Trp	Ile	Gly	Gly	Asn	Cys	Thr	Val	Ser	Leu	Met	Leu	Met	Ala	Leu
	130					135					140				
Asn	Gly	Leu	Phe	Lys	Ala	Asp	Leu	Val	Glu	Trp	Ala	Thr	Ser	Met	Thr
145					150					155				160	
Tyr	Gln	Ala	Ala	Ser	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Asn	Met	Arg	Glu	Leu	Ile
				165					170					175	
Ser	Gln	Met	Gly	Val	Val	Asn	Ala	Ser	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Ala	Asp
		180						185					190		
Pro	Ala	Ser	Ala	Ile	Leu	Gln	Ile	Asp	Lys	Thr	Val	Ala	Asp	Thr	Ile
		195					200						205		
Arg	Ser	Glu	Glu	Leu	Pro	Lys	Ser	Asn	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Ala	Gly
	210					215					220				
Ser	Leu	Ile	Pro	Trp	Ile	Asp	Lys	Asp	Leu	Gly	Asn	Gly	Gln	Ser	Lys
225					230					235				240	
Glu	Glu	Trp	Lys	Gly	Gly	Val	Xaa	Thr	Asn	Lys	Ile	Leu	Gly	Arg	Glu
				245					250					255	
Ala	Asn	Pro	Ile	Val	Ile	Asp	Gly	Leu	Cys	Val	Arg	Ile	Gly	Ala	Met
			260					265					270		
Arg	Cys	His	Ser	Gln	Ala	Leu	Thr	Ile	Lys	Leu	Arg	Lys	Asp	Val	Pro
		275					280						285		
Leu	Asp	Glu	Ile	Asn	Gln	Met	Leu	Ala	Glu	Ala	Asn	Asp	Trp	Ala	Lys



290	295	300
Val Ile Pro Asn Glu Arg Glu Val Ser Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala		
305	310	315
Ala Ile Thr Gly Ser Leu Ala Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu		320
	325	330
Ala Met Gly Gly Glu Tyr Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu		335
	340	345
Leu Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Ile Leu Val		350
	355	360
Glu Ser		365
370		

<210> 9

<211> 3098

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<221> CDS

<222> (1268)..(2155)

<400> 9

```

cgtgccaaact tgcattgectg ccggtcgctc tagaggatca attgctggca acatttgagt 60
acattattcg cctttgcatg gtaaaggcct atggtcttga tgtaactttc aagacctgcc 120
agccccaaat ccaggatagc ctgcggtgtg ttggccacct tgaacaattt gcgggtggca 180
atattgacac ctttgtctgt cgcctgtgca gacaagatga cggcaatcag taattcgaac 240
gtggagctat gctccagctc agtgggttga ttggggatgg cttgggccag ccgctcaaat 300
atgccagtc ttttttgtgc attcataaaa cggtttcaat cataggtcac aggttcaacc 360
tgtcttttgc gctttgacgc gcgccatggt tgcggcaatg gcatttttct tgagcacctc 420
agttgagggt gtctcggtcg tagcaagcgt ctggttgcgt ttgctgtagg tttgggcggt 480
ctcccgtttt tcaagggcga ggcgagaaag gcgttgctgg tggcgttgct tcgctaccgc 540
ggcttcagct tcattcatgg cggtagcccg accgggaatc gtttgcattc gtatgcagtc 600
caccgggcag ggcggtaaac atagctcaca gccagtgcatt tcctgggaaa tcaccgtatg 660
catcagtttg gatgcgcca aaatggcatc aacgggacag gcctgtatac acagggtgca 720
gccgatgcatt gtttctcat caatcaagge caccgctttg ggtttggtga tgccgtgggc 780
cggatttaat gcctggaaag gacgttgcag taatttggca agcgcattga tgcccgcttc 840
tcctccagge ggacattggt tgatattggt ctctccgcgg gcgatcgctt cagcataagg 900
tttgcatccc tcgtaaccgc attggcgga ttgagtttgc ggtaataacc cgctgatctt 960

```



tgcaatgagg tcgacaaagc gttctggcag ctcaggcgca gtccttcga cttcaatcat 1020
 gtgatggcag gtgagctgc attcggtcct ggctaaatag ccgtttaaga tgggttgcta 1080
 agagttttat tataaccgaa accttgcttt tcctttggcc gggagctagg cgaaaaagc 1140
 ttgccgcagt tgggtgccag tgattttgcc gccgtcttgc gcttgatatcc gtccagatac 1200
 agcaagtagg cgcgttcttt ggcgttagac cggataatca gttaaaatat tcgctttatt 1260
 cttaaag atg gcg cta ggt atg tta acg ggc agt ttg gtc gca atc gtg 1309
 Met Ala Leu Gly Met Leu Thr Gly Ser Leu Val Ala Ile Val
 1 5 10
 acc ccc atg ttt gaa gat gga cgt ttg gat ctg gac gcc ctc aaa aag 1357
 Thr Pro Met Phe Glu Asp Gly Arg Leu Asp Leu Asp Ala Leu Lys Lys
 15 20 25 30
 ctg gtc gac ttt cat gta gag gca ggg aca gat ggt att gtc atc gtt 1405
 Leu Val Asp Phe His Val Glu Ala Gly Thr Asp Gly Ile Val Ile Val
 35 40 45
 ggc acg act ggc gag tcg ccc acg gtg gat gta gat gag cat tgt ctg 1453
 Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Val Asp Val Asp Glu His Cys Leu
 50 55 60
 ctg atc aaa acc acg atc gag cat gtc gcc aag cgc gtg cca gtc att 1501
 Leu Ile Lys Thr Thr Ile Glu His Val Ala Lys Arg Val Pro Val Ile
 65 70 75
 gcc ggt act ggc gca aat tcc act gct gaa gcc att gaa ctg act gcc 1549
 Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ser Thr Ala Glu Ala Ile Glu Leu Thr Ala
 80 85 90
 aag gcc aag gcg ctt ggc gca gac gcc tgc ctg ctg gtg gca ccg tat 1597
 Lys Ala Lys Ala Leu Gly Ala Asp Ala Cys Leu Leu Val Ala Pro Tyr
 95 100 105 110
 tac aac aag ccc tcg caa gag ggt ttg tac cag cac ttt aaa gcc gtg 1645
 Tyr Asn Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Val
 115 120 125
 gct gag gcg gtc gat att ccg caa att ctc tat aat gtg cca ggc cgc 1693
 Ala Glu Ala Val Asp Ile Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Gly Arg
 130 135 140
 acc ggt tgc gac ttg tct aac gac acc gta ttg cgc ctg gcg cag att 1741
 Thr Gly Cys Asp Leu Ser Asn Asp Thr Val Leu Arg Leu Ala Gln Ile
 145 150 155
 cgc aac att gtc ggg att aag gat gcg act gga ggg att gag cgc ggt 1789
 Arg Asn Ile Val Gly Ile Lys Asp Ala Thr Gly Gly Ile Glu Arg Gly
 160 165 170



acc gat ttg ttg ttg cgt gca cca gct gat ttc gcc att tac agc ggg 1837
 Thr Asp Leu Leu Leu Arg Ala Pro Ala Asp Phe Ala Ile Tyr Ser Gly
 175 180 185 190
 gat gat gcc act gcg ctg gcc ctg atg tta tta ggg ggg aaa ggc gtg 1885
 Asp Asp Ala Thr Ala Leu Ala Leu Met Leu Leu Gly Gly Lys Gly Val
 195 200 205
 att tcg gtc acg gcc aat gtc gcg ccc aaa tta atg cat gaa atg tgc 1933
 Ile Ser Val Thr Ala Asn Val Ala Pro Lys Leu Met His Glu Met Cys
 210 215 220
 gag cat gct ttg aat ggc aac ctg gcc gca gcc aaa gcg gcc aat gcc 1981
 Glu His Ala Leu Asn Gly Asn Leu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Asn Ala
 225 230 235
 aaa ctg ttt gca ttg cac cag aag ttg ttt gta gaa gcg aac ccg att 2029
 Lys Leu Phe Ala Leu His Gln Lys Leu Phe Val Glu Ala Asn Pro Ile
 240 245 250
 cca gtg aaa tgg gta tta caa caa atg gga atg att gcc act ggc atc 2077
 Pro Val Lys Trp Val Leu Gln Gln Met Gly Met Ile Ala Thr Gly Ile
 255 260 265 270
 cgt ttg ccg ctg gtc aat tta tcc agc caa tat cat gaa gta ttg cgc 2125
 Arg Leu Pro Leu Val Asn Leu Ser Ser Gln Tyr His Glu Val Leu Arg
 275 280 285
 aac gcc atg aag cag gca gaa att gcc gct tgateggcta aaactaattt 2175
 Asn Ala Met Lys Gln Ala Glu Ile Ala Ala
 290 295
 aggggtgaaac aagtgaata catgagtcac gtttggttac aacgtttggt gctggccagt 2235
 ctggtcacag cgctttcagc gtgcgattcc atcccgttta ttgataatag ttctgactac 2295
 aagggcgcag gtcgtccag gccacttgaa gtgcgcgcag acctgaccgc ggtgcgtacc 2355
 agcagtactt acaatgtgcc tggtagcacc agttactctg cctatagcca gaaccaggaa 2415
 gtgcaagagc agaatggtcc acagcctgtg ctgcagata tgaaaaacgt gcgcatggtg 2475
 aaagcaggcc agcagcgttg gctggtggtc aatgcgcctc cggaaaaaat ctggccgatt 2535
 gtgcgtgatt tctggctgga tcaaggcttt gctgtcaggg tagagaatcc tgagcttggc 2595
 gtgattgaaa ccgagtgggt gcaatctgat gccatcaagc ctaaggaaga taaccgtggc 2655
 tatggtgaaa agtttgatgc ctggctggat aaactttctg gttttgccga caggcgtaaa 2715
 ttccgtacgc gtctggaacg tggggagaaa gacggcacca ccgaaatcta tatgacgcac 2775
 cgtactgtcg ccggtgcacc ggatgatggc aaaaattatg tgcagaccca attgggtgtc 2835
 attgataccg gttatcgcce caacgcggct gaaaacaaga acaatgccgg taaagagttt 2895
 gatgctgact tggatgcaga attactccgt cgaatgatgg tgaaattagg tctggatgag 2955
 cagaaagcag accaggtgat ggcacaatct gttcagaca agcgtgcaga tgttggtcaag 3015



20/31

gagtctgacc agagcgtcac cttgaagttg aatgagccgt ttgaccgtgc ctggcgccgt 3075
 gtggcctggc ctggatcccc ggg 3098

<210> 10

<211> 296

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 10

Met	Ala	Leu	Gly	Met	Leu	Thr	Gly	Ser	Leu	Val	Ala	Ile	Val	Thr	Pro
1				5					10					15	
Met	Phe	Glu	Asp	Gly	Arg	Leu	Asp	Leu	Asp	Ala	Leu	Lys	Lys	Leu	Val
			20					25					30		
Asp	Phe	His	Val	Glu	Ala	Gly	Thr	Asp	Gly	Ile	Val	Ile	Val	Gly	Thr
		35					40					45			
Thr	Gly	Glu	Ser	Pro	Thr	Val	Asp	Val	Asp	Glu	His	Cys	Leu	Leu	Ile
	50					55					60				
Lys	Thr	Thr	Ile	Glu	His	Val	Ala	Lys	Arg	Val	Pro	Val	Ile	Ala	Gly
65				70					75				80		
Thr	Gly	Ala	Asn	Ser	Thr	Ala	Glu	Ala	Ile	Glu	Leu	Thr	Ala	Lys	Ala
			85						90				95		
Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Asp	Ala	Cys	Leu	Leu	Val	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Asn
		100						105				110			
Lys	Pro	Ser	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Gln	His	Phe	Lys	Ala	Val	Ala	Glu
	115					120					125				
Ala	Val	Asp	Ile	Pro	Gln	Ile	Leu	Tyr	Asn	Val	Pro	Gly	Arg	Thr	Gly
	130					135					140				
Cys	Asp	Leu	Ser	Asn	Asp	Thr	Val	Leu	Arg	Leu	Ala	Gln	Ile	Arg	Asn
145				150					155				160		
Ile	Val	Gly	Ile	Lys	Asp	Ala	Thr	Gly	Gly	Ile	Glu	Arg	Gly	Thr	Asp
		165						170				175			
Leu	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro	Ala	Asp	Phe	Ala	Ile	Tyr	Ser	Gly	Asp	Asp
		180					185					190			
Ala	Thr	Ala	Leu	Ala	Leu	Met	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Gly	Val	Ile	Ser
	195					200					205				
Val	Thr	Ala	Asn	Val	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	His	Glu	Met	Cys	Glu	His
	210					215					220				
Ala	Leu	Asn	Gly	Asn	Leu	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Asn	Ala	Lys	Leu



225	230	235	240
Phe Ala Leu His Gln Lys Leu Phe Val Glu Ala Asn Pro Ile Pro Val			
	245	250	255
Lys Trp Val Leu Gln Gln Met Gly Met Ile Ala Thr Gly Ile Arg Leu			
	260	265	270
Pro Leu Val Asn Leu Ser Ser Gln Tyr His Glu Val Leu Arg Asn Ala			
	275	280	285
Met Lys Gln Ala Glu Ile Ala Ala			
	290	295	

<210> 11

<211> 3390

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<221> CDS

<222> (2080)..(2883)

<400> 11

```

ccgcaggtcg ctctagagga tcagagttgg acggacaagc tgaagttttg ggagtctgaa 60
gaagctgcgg gcgaagtgat aaagcagctg aatcaactgt agccactgca agcgacgaat 120
gaaagcaaaag gcgctgcact cgctaaggat gaggcagccg aatctcagaa aaccacgtca 180
gagcctgtca aggccgagca agaggtattg cctcggcca ctgcaacaaa taattcagct 240
gctgcagcga cattggctga agaagaagtg gttccctaca ttccggaggg ggagtatcag 300
gctgcaccca ctccagaaga gatggccaag ggtaatctgg atgtcagtga aaaccaggtt 360
actgaggcta aggcacatcc agtgaatgaa aaggaaatgg ctgccccaat tgcagatacg 420
gttgagccac caccgtttt tcagcaggaa ccgatggcag aacctattgt agcggctgaa 480
cccgaacccg tattgccacc gcccgtaaaa gccgaaccag ctgtgaagaa taccacagcg 540
ccagttgttg ccgcagccac tgttgcagcg gcggcaacca agactgctga atctgagtca 600
gttaaatcca aacctgttga tcctaagcct gtggaagcaa aaaccgctgt atcaaaaact 660
gaagtacaaa caccgcgggc acaggcacct gctgcggcag cggccgttga agatgacgag 720
gtcattccat atattcccga aggtgaatat gtggctcctg tcattcctag tgaggccgaa 780
atggttaaag gcaatatggc ggaggcaaat gcacctgcga ctgatgctca agcgcgccag 840
gtaactgaaa aaggggtggc acccacatcg gatgcggcag cagagccatc accgacattt 900
gtcgtgagc aattgccaga accagagcca gaacctgaat tgccaccgcc gcctccgcca 960
tccgtcagca agcctgttgt gagagaggta gcgccagtgg ctgcgtggc agcagaagaa 1020
gagaaaccag tcgctgcgca gcctgagact gaggcagccg ctgccaaggt tgttgagcct 1080

```



gcatcggtcg cctccccgtg ggcgacgcca gaagcgccag ctggtgatgc tgaaatcaac 1140
 caggctgtgg cggcatgggc acaagcttgg cgcagcaagg acattaaaaa ctacctcgct 1200
 gcatatgccc ctgacttcat gccagaaggg ttgccttcca gaaaggcatg ggagtcgcaa 1260
 cgcaaacagc gtttatctgc aggccagggt gcgattacac tcgtactaaa taatgtgcag 1320
 attcagcgtg acggtaccac tgtcgccgtg cagtttgagc aaaaatatgc tgctaaagtt 1380
 tataaagatg aattgggtcaa aacactggaa atgcgttacg agccaacgca gaaacgttgg 1440
 ttgatcacac gtgaacgtgt tgccccitta accggtttgc cagtagcgag tgtgccaacg 1500
 acccgctgc cagcagtcgc tgcagcgta tccaatacgg atgtggtcga gtcagctgtg 1560
 ccaccgacac aatcgacatc atctgcgcct gtagcggaag tgagtgttga atcagcgatt 1620
 gacgcctggg cacaggcttg ggcagtaaa aacatcaatg cttactttgc ggcgtattct 1680
 ccagaatttg tgccggaggg attgccaaac agaggtgtct gggaagcgca acgtaaaaag 1740
 cgcttgtccc cacagcaggg caagatcagc ctggatgtca cgaatgtaag cgtgagccgc 1800
 gaaggagaaa cagccgtggc cacccttagg cagaaatatg cgtctaagc ctatcgatgat 1860
 gaagtagtga agcgtctaca gttaaaactg gatgctgcaa gcaatcgctg gctgattgtg 1920
 cgtgaaagta ccggtagtga ggcagaagt ccaatgggca agcagtcagt gagtgcgcca 1980
 gaagagagct cggaacatca ggatggtgct ctggagccga tcggatttta atggtctgct 2040
 gatgtcgtgg ttttaagtatt aaaaataatt gagtgagtt atg ttg aaa gta gtg 2094
 Met Leu Lys Val Val
 1 5
 att gct ggc gtg tct ggt cgt atg gga cat gcc tta ctg gat gga gtt 2142
 Ile Ala Gly Val Ser Gly Arg Met Gly His Ala Leu Leu Asp Gly Val
 10 15 20
 ttt tct gat aac ggc ttg cag ttg cac gcg gca ctc gat cgt gct gaa 2190
 Phe Ser Asp Asn Gly Leu Gln Leu His Ala Ala Leu Asp Arg Ala Glu
 25 30 35
 agc gcc atg ata ggg cgg gat gca ggc gag cag ttt ggc aag gtc agt 2238
 Ser Ala Met Ile Gly Arg Asp Ala Gly Glu Gln Phe Gly Lys Val Ser
 40 45 50
 ggc gtg aaa atc acg gct gac atc cat gcc gca ttg gtc ggt gcc gat 2286
 Gly Val Lys Ile Thr Ala Asp Ile His Ala Ala Leu Val Gly Ala Asp
 55 60 65
 gtg ctg gtg gat ttc acg cgg ccg gaa gcc agt atg caa tat tta caa 2334
 Val Leu Val Asp Phe Thr Arg Pro Glu Ala Ser Met Gln Tyr Leu Gln
 70 75 80 85
 gcc tgc cag caa gcc aac gtt aaa tta gtg att ggt act acc ggg ttt 2382
 Ala Cys Gln Gln Ala Asn Val Lys Leu Val Ile Gly Thr Thr Gly Phe
 90 95 100
 agt gag gca gaa aag gcc agt att gag gct gcg tcc aaa aat atc ggt 2430



Ser Glu Ala Glu Lys Ala Ser Ile Glu Ala Ala Ser Lys Asn Ile Gly
 105 110 115
 atc gta ttt gct cca aac atg agc gta ggg gtc acc ctc ttg att aac 2478
 Ile Val Phe Ala Pro Asn Met Ser Val Gly Val Thr Leu Leu Ile Asn
 120 125 130
 ctg gtt gag caa gcc gca cgg gtg ctc aat gaa ggc tat gat att gag 2526
 Leu Val Glu Gln Ala Ala Arg Val Leu Asn Glu Gly Tyr Asp Ile Glu
 135 140 145
 gtg gtt gaa atg cat cac cgc cat aag gtg gat gcg cct tca ggc acg 2574
 Val Val Glu Met His His Arg His Lys Val Asp Ala Pro Ser Gly Thr
 150 155 160 165
 gct tta cgg ttg ggt gag gct gcg gca aaa ggg att gat aaa gcg ctt 2622
 Ala Leu Arg Leu Gly Glu Ala Ala Ala Lys Gly Ile Asp Lys Ala Leu
 170 175 180
 aaa gat tgt gct gtg tat gcg cgc gaa ggc gtg act ggt gaa cgc gaa 2670
 Lys Asp Cys Ala Val Tyr Ala Arg Glu Gly Val Thr Gly Glu Arg Glu
 185 190 195
 gcg ggc acg att ggt ttt gca acc tta cgt ggt ggg gat gtg gtc ggt 2718
 Ala Gly Thr Ile Gly Phe Ala Thr Leu Arg Gly Gly Asp Val Val Gly
 200 205 210
 gac cat acg gtg gtt ctg gct ggt gtg ggt gag cga gta gag tta acg 2766
 Asp His Thr Val Val Leu Ala Gly Val Gly Glu Arg Val Glu Leu Thr
 215 220 225
 cat aaa gca tca agc cgt gcc aca ttt gca caa ggt gcg tta cgt gcg 2814
 His Lys Ala Ser Ser Arg Ala Thr Phe Ala Gln Gly Ala Leu Arg Ala
 230 235 240 245
 gct aaa ttt ctg gct gat aaa ccc aag gga ttg ttt gat atg cgt gat 2862
 Ala Lys Phe Leu Ala Asp Lys Pro Lys Gly Leu Phe Asp Met Arg Asp
 250 255 260
 gtg ttg gga ttt gaa aag aac tgatcttag taggcgatcc cgtctggcta 2913
 Val Leu Gly Phe Glu Lys Asn
 265
 aggtctggca ggaatcgtct gatgcttctg agttgccctt gaggggctg tcaatgtacg 2973
 ctataatgct gtaattctga aacgggaaga gtcaacaag cttttcccgt tttgcacatc 3033
 tattcactgc agcttgaatt tcacttcag ccattggtgaa cctctaaaa gatgtgttcc 3093
 gtgtcaaaact taaggagcta aagggtgtcaa aaacaattcc agcgattctc gtgttagcag 3153
 atggaactgt tttaagggc attagcattg gcgcttcgg tcatacggta ggtgaggtgg 3213
 tgtttaatac ctccatcacc ggttatcagg agattcttac cgatccttcc tataccgaac 3273



24/31

aaatcgtgac actgacctat ccgcacattg gtaactacgg gaccaatcgt gaagatggga 3333
 gtcaggtaaa gtctatgctg cgggtctgat ccccgggacc gagccgggtt cgtaaag 3390

<210> 12

<211> 268

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 12

Met	Leu	Lys	Val	Val	Ile	Ala	Gly	Val	Ser	Gly	Arg	Met	Gly	His	Ala
1				5					10					15	
Leu	Leu	Asp	Gly	Val	Phe	Ser	Asp	Asn	Gly	Leu	Gln	Leu	His	Ala	Ala
			20					25					30		
Leu	Asp	Arg	Ala	Glu	Ser	Ala	Met	Ile	Gly	Arg	Asp	Ala	Gly	Glu	Gln
		35					40					45			
Phe	Gly	Lys	Val	Ser	Gly	Val	Lys	Ile	Thr	Ala	Asp	Ile	His	Ala	Ala
	50					55					60				
Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Val	Leu	Val	Asp	Phe	Thr	Arg	Pro	Glu	Ala	Ser
65				70					75				80		
Met	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ala	Cys	Gln	Gln	Ala	Asn	Val	Lys	Leu	Val	Ile
			85					90					95		
Gly	Thr	Thr	Gly	Phe	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	Ala	Ser	Ile	Glu	Ala	Ala
			100					105					110		
Ser	Lys	Asn	Ile	Gly	Ile	Val	Phe	Ala	Pro	Asn	Met	Ser	Val	Gly	Val
		115					120				125				
Thr	Leu	Leu	Ile	Asn	Leu	Val	Glu	Gln	Ala	Ala	Arg	Val	Leu	Asn	Glu
	130					135					140				
Gly	Tyr	Asp	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Met	His	His	Arg	His	Lys	Val	Asp
145				150					155				160		
Ala	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Leu	Arg	Leu	Gly	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Gly
			165					170					175		
Ile	Asp	Lys	Ala	Leu	Lys	Asp	Cys	Ala	Val	Tyr	Ala	Arg	Glu	Gly	Val
		180					185						190		
Thr	Gly	Glu	Arg	Glu	Ala	Gly	Thr	Ile	Gly	Phe	Ala	Thr	Leu	Arg	Gly
	195					200						205			
Gly	Asp	Val	Val	Gly	Asp	His	Thr	Val	Val	Leu	Ala	Gly	Val	Gly	Glu
	210					215					220				
Arg	Val	Glu	Leu	Thr	His	Lys	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Phe	Ala	Gln



25/31

225	230	235	240
Gly Ala Leu Arg	Ala Ala Lys Phe	Leu Ala Asp Lys	Pro Lys Gly Leu
	245	250	255
Phe Asp Met Arg	Asp Val Leu Gly	Phe Glu Lys	Asn
	260	265	

<210> 13

<211> 2566

<212> DNA

<213> Methylophilus methylotrophus

<220>

<221> CDS

<222> (751)..(1995)

<400> 13

```

tgcttttaggg ggaacctaga ggatccccct acccgaggaa gaagtgagcc aacatgtact 60
tccagtcgta ccatcaaaag tagaagtttt cggcgttata ctgattcaca gtaaacgaaa 120
aattgcccatt attctgaccg gatttaccgg tggcttttaa ggtataagtg gtcgctgact 180
ggtttctcaat gctgtaatca aaaaatttgg catcactggg gacacaggca aatcccacat 240
atgtgaagtt gtcctgataa aactgttcgg cctgcacacg gcaattggca agattggcag 300
gcgcttccgc ggcattaccg cttttgatgt aatcctgata gcctggatat gcgatgctgg 360
ccaagatacc cataatggcc accacgacca tgactttetat caggctgaat ccgtactgat 420
ttgaggactt cattatcaaa ccccttttta gatagcetta tcatgcaaac aggcagctgt 480
catgtccagc atcagccgac caatggtcag gattaccga cgaacggtca aaccactaaa 540
acgcccagtc actggtgcc a tgagcaactg caggtttaat gataaaatgg cactcaattt 600
acattggact gtgaacatgt tttccttcta tacgagatta ttggcggttg cctgctatt 660
ggcacaattg agtgcctgtg gtctcaaagg ggacctgtat attcctgagc gccaatacce 720
tcaaacgcct caacaagata agtcttcata gtg acc gct ttt tca atc caa caa 774
Val Thr Ala Phe Ser Ile Gln Gln

```

1

5

```

ggc cta cta cat gcc gag aat gta gcc ctg cgt gac att gca caa acg 822
Gly Leu Leu His Ala Glu Asn Val Ala Leu Arg Asp Ile Ala Gln Thr
10 15 20
cat caa acg ccc act tac gtc tat tca cgt gcc gcc ttg acg act gct 870
His Gln Thr Pro Thr Tyr Val Tyr Ser Arg Ala Ala Leu Thr Thr Ala
25 30 35 40
ttc gag cgt ttt cag gca ggc ctg act gga cat gac cat ttg atc tgc 918

```



26/31

Phe	Glu	Arg	Phe	Gln	Ala	Gly	Leu	Thr	Gly	His	Asp	His	Leu	Ile	Cys	
				45					50					55		
ttt	gct	gtc	aaa	gcc	aac	cca	agc	ctg	gcc	att	ctc	aac	ctg	ttt	gcg	966
Phe	Ala	Val	Lys	Ala	Asn	Pro	Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Asn	Leu	Phe	Ala	
			60					65					70			
cga	atg	gga	gcg	ggc	ttt	gat	att	gtg	tcc	ggg	ggg	gag	ctg	gca	cgc	1014
Arg	Met	Gly	Ala	Gly	Phe	Asp	Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Ala	Arg	
			75				80					85				
gtc	ttg	gcc	gca	ggg	ggc	gac	ccg	aaa	aaa	gtg	gtg	ttt	tct	ggg	gtg	1062
Val	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Asp	Pro	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Ser	Gly	Val	
	90					95				100						
ggc	aaa	tcc	cat	gcg	gaa	atc	aaa	gcc	gcg	ctt	gaa	gcg	ggc	att	ctt	1110
Gly	Lys	Ser	His	Ala	Glu	Ile	Lys	Ala	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Ile	Leu	
105				110				115					120			
tgc	ttc	aac	gtg	gaa	tca	gtg	aat	gag	cta	gac	cgc	atc	cag	cag	gtg	1158
Cys	Phe	Asn	Val	Glu	Ser	Val	Asn	Glu	Leu	Asp	Arg	Ile	Gln	Gln	Val	
			125					130				135				
gcg	gcc	agc	ctg	ggc	aaa	aaa	gcg	cct	att	tcc	ctg	cgc	gtg	aac	ccc	1206
Ala	Ala	Ser	Leu	Gly	Lys	Lys	Ala	Pro	Ile	Ser	Leu	Arg	Val	Asn	Pro	
			140					145				150				
aat	gtg	gat	gcc	aaa	aca	cat	ccc	tat	att	tcc	cac	ccg	gct	ctc	aaa	1254
Asn	Val	Asp	Ala	Lys	Thr	His	Pro	Tyr	Ile	Ser	His	Pro	Ala	Leu	Lys	
			155				160					165				
aac	aat	aaa	ttt	ggg	gtg	gca	ttt	gaa	gat	gcc	ttg	ggc	ctc	tat	gaa	1302
Asn	Asn	Lys	Phe	Gly	Val	Ala	Phe	Glu	Asp	Ala	Leu	Gly	Leu	Tyr	Glu	
	170					175				180						
aaa	gcg	gcg	caa	ctg	cca	aac	atc	gag	gta	cac	ggc	gta	gat	tgc	cat	1350
Lys	Ala	Ala	Gln	Leu	Pro	Asn	Ile	Glu	Val	His	Gly	Val	Asp	Cys	His	
185				190				195				200				
atc	ggc	tgc	caa	atc	act	gag	ctg	tca	cct	ttc	ctc	gat	gcc	ttg	gat	1398
Ile	Gly	Ser	Gln	Ile	Thr	Glu	Leu	Ser	Pro	Phe	Leu	Asp	Ala	Leu	Asp	
			205					210				215				
aaa	gta	ttg	ggc	ctg	gta	gat	gca	ttg	gcc	gcc	aaa	ggc	att	cat	atc	1446
Lys	Val	Leu	Gly	Leu	Val	Asp	Ala	Leu	Ala	Ala	Lys	Gly	Ile	His	Ile	
			220					225				230				
cag	cat	ata	gac	gtt	ggc	ggc	ggg	gtc	ggg	att	act	tac	agc	gac	gaa	1494
Gln	His	Ile	Asp	Val	Gly	Gly	Gly	Val	Gly	Ile	Thr	Tyr	Ser	Asp	Glu	
			235					240				245				



acg cca cca gac ttt gca gcc tac act gca gcg att ctt aaa aag ctg 1542
 Thr Pro Pro Asp Phe Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Ile Leu Lys Lys Leu
 250 255 260
 gca ggc agg aat gta aaa gtg ttg ttt gag ccc ggc cgt gcc ctg gtg 1590
 Ala Gly Arg Asn Val Lys Val Leu Phe Glu Pro Gly Arg Ala Leu Val
 265 270 275 280
 ggt aac gcc ggt gtg ctg ctg acc aag gtc gaa tac ctg aaa cct ggc 1638
 Gly Asn Ala Gly Val Leu Leu Thr Lys Val Glu Tyr Leu Lys Pro Gly
 285 290 295
 gaa acc aaa aac ttt gcg att gtc gat gcc gcc atg aac gac ctc atg 1686
 Glu Thr Lys Asn Phe Ala Ile Val Asp Ala Ala Met Asn Asp Leu Met
 300 305 310
 cgc ccg gct ttg tat gat gct ttc cac aac att acg acc att gcc act 1734
 Arg Pro Ala Leu Tyr Asp Ala Phe His Asn Ile Thr Thr Ile Ala Thr
 315 320 325
 tct gca gcc ccc gca caa atc tat gag atc gtt ggc ccg gtt tgc gag 1782
 Ser Ala Ala Pro Ala Gln Ile Tyr Glu Ile Val Gly Pro Val Cys Glu
 330 335 340
 agt ggt gac ttt tta ggc cat gac cgt aca ctt gcg atc gaa gaa ggt 1830
 Ser Gly Asp Phe Leu Gly His Asp Arg Thr Leu Ala Ile Glu Glu Gly
 345 350 355 360
 gat tac ctg gcg att cac tcc gca ggc gct tat ggc atg agc atg gcc 1878
 Asp Tyr Leu Ala Ile His Ser Ala Gly Ala Tyr Gly Met Ser Met Ala
 365 370 375
 agc aac tac aac acg cgc gcc cgt gcc gca gag gta ttg gtt gat ggt 1926
 Ser Asn Tyr Asn Thr Arg Ala Arg Ala Ala Glu Val Leu Val Asp Gly
 380 385 390
 gac cag gtg cat gtg atc cgt gaa cgt gaa caa att gcc gac ctg ttt 1974
 Asp Gln Val His Val Ile Arg Glu Arg Glu Gln Ile Ala Asp Leu Phe
 395 400 405
 aaa ctg gag cgt acg ctg cca taacattgac ggcaaccct aataaaaaaa 2025
 Lys Leu Glu Arg Thr Leu Pro
 410 415
 ccgaagccgc caagcttcgg ttttttatta atagcgcac ctttaatacaa agatcacggt 2085
 cttgttcgcg tagagcaaga ttctatgctc aatatgccag cgcacggctt tggaaagcac 2145
 aacacgtcc aggtcacggc ctttctggat caggctctcc acctgacgc ggtgtgaaat 2205
 gcgcgccaag tctgtctcaa taatcgcccc ctcatccaac acctctgtca cataatgact 2265
 ggctgcaccg atcagtttca cgccacgctc aaacgcacgg tggtaaggac gtgcgccgat 2325



aaatgctggc aggaatgagt ggtggtgaat gttgataatc cgctgaggat accgtgagac 2385
 aaaatctggt gacagaatct gcatgtagcg tgccagcaca atcagggtcaa tcttgtgttg 2445
 atcaaacagg gcaaactgct gngcctctac ctctgccttg gtttaccttg gtcacggta 2505
 aatagtgaag cgggatgcca taaaactgcg ccagggggat cctctgggtc cccctaaagc 2565
 a 2566

<210> 14

<211> 415

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 14

Val	Thr	Ala	Phe	Ser	Ile	Gln	Gln	Gly	Leu	Leu	His	Ala	Glu	Asn	Val
1				5					10					15	
Ala	Leu	Arg	Asp	Ile	Ala	Gln	Thr	His	Gln	Thr	Pro	Thr	Tyr	Val	Tyr
			20					25					30		
Ser	Arg	Ala	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala	Phe	Glu	Arg	Phe	Gln	Ala	Gly	Leu
		35					40					45			
Thr	Gly	His	Asp	His	Leu	Ile	Cys	Phe	Ala	Val	Lys	Ala	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				
Leu	Ala	Ile	Leu	Asn	Leu	Phe	Ala	Arg	Met	Gly	Ala	Gly	Phe	Asp	Ile
	65				70					75				80	
Val	Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Asp	Pro
			85					90						95	
Lys	Lys	Val	Val	Phe	Ser	Gly	Val	Gly	Lys	Ser	His	Ala	Glu	Ile	Lys
		100					105					110			
Ala	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Ile	Leu	Cys	Phe	Asn	Val	Glu	Ser	Val	Asn
		115					120					125			
Glu	Leu	Asp	Arg	Ile	Gln	Gln	Val	Ala	Ala	Ser	Leu	Gly	Lys	Lys	Ala
	130					135					140				
Pro	Ile	Ser	Leu	Arg	Val	Asn	Pro	Asn	Val	Asp	Ala	Lys	Thr	His	Pro
	145				150					155				160	
Tyr	Ile	Ser	His	Pro	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Phe	Gly	Val	Ala	Phe
			165					170					175		
Glu	Asp	Ala	Leu	Gly	Leu	Tyr	Glu	Lys	Ala	Ala	Gln	Leu	Pro	Asn	Ile
		180					185					190			
Glu	Val	His	Gly	Val	Asp	Cys	His	Ile	Gly	Ser	Gln	Ile	Thr	Glu	Leu
		195					200					205			



29/31

Ser Pro Phe Leu Asp Ala Leu Asp Lys Val Leu Gly Leu Val Asp Ala
 210 215 220
 Leu Ala Ala Lys Gly Ile His Ile Gln His Ile Asp Val Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Val Gly Ile Thr Tyr Ser Asp Glu Thr Pro Pro Asp Phe Ala Ala Tyr
 245 250 255
 Thr Ala Ala Ile Leu Lys Lys Leu Ala Gly Arg Asn Val Lys Val Leu
 260 265 270
 Phe Glu Pro Gly Arg Ala Leu Val Gly Asn Ala Gly Val Leu Leu Thr
 275 280 285
 Lys Val Glu Tyr Leu Lys Pro Gly Glu Thr Lys Asn Phe Ala Ile Val
 290 295 300
 Asp Ala Ala Met Asn Asp Leu Met Arg Pro Ala Leu Tyr Asp Ala Phe
 305 310 315 320
 His Asn Ile Thr Thr Ile Ala Thr Ser Ala Ala Pro Ala Gln Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ile Val Gly Pro Val Cys Glu Ser Gly Asp Phe Leu Gly His Asp
 340 345 350
 Arg Thr Leu Ala Ile Glu Glu Gly Asp Tyr Leu Ala Ile His Ser Ala
 355 360 365
 Gly Ala Tyr Gly Met Ser Met Ala Ser Asn Tyr Asn Thr Arg Ala Arg
 370 375 380
 Ala Ala Glu Val Leu Val Asp Gly Asp Gln Val His Val Ile Arg Glu
 385 390 395 400
 Arg Glu Gln Ile Ala Asp Leu Phe Lys Leu Glu Arg Thr Leu Pro
 405 410 415

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplification of tac promoter

<400> 15

agggaattcc ccgttctgga taatgttttt tgcgcgcac

39



<210> 16

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplification of tac promoter

<400> 16

cggatgcac tagagttaac ctgcagggtg aaattgttat ccgtcacaa ttccacac 58

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplification of dapA*24 gene

<400> 17

tgacctgcag gtttgacacag aggatggccc atgtt 35

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplification of dapA*24 gene

<400> 18

cattctagat ccctaaactt tacagcaaac cggcat 36

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> primer for amplification of lysC*80 gene

<400> 19

gaacctgcag gccctgacac gaggtagatt atgtc

35

<210> 20

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for amplification of lysC*80 gene

<400> 20

ctttcggcta gaagagcgag atgcagataa aaaaattaaa ggcaattatt ctccg

55



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N1/21, 1/32, 9/00, 15/52, C12P13/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/20-1/21, 9/00-9/99, 15/52-15/61,
C12P13/04-13/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 35831, A2 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED), 16 September, 1981 (16.09.81) & NO, 8100773, A & DK, 8100952, A & JP, 56-140893, A & PT, 72630, A & CA, 1187011, A & DE, 3173415, G & RO, 92662, A	1, 4, 11-14
X	WINDASS, J. D. et al., "Improved conversion of methanol to single-cell protein by Methylophilus methylophilus", Nature, October 2, 1980, Volume 287, pp. 396-401	1, 4, 11-14
X	SCHENDEL, Frederick J. et al., "Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene Coding for Aspartokinase II from a Thermophilic Methylophilic Bacillus sp.", Applied and Environmental Microbiology, September 1992, Volume 58, Number 9, pages 2806-2814 GenBank Accession No. M93419	17
X	HOANG, Tung T. et al., "Molecular genetic analysis of the region containing the essential Pseudomonas aeruginosa asd gene encoding aspartate- β -semialdehyde	19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
05 July, 2000 (05.07.00)Date of mailing of the international search report
18 July, 2000 (18.07.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02295

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	dehydrogenase", Microbiology, March 1997, Volume 143, Part 3, pp. 899-907 GenBank Accession No.U11055	
X	YAMAMOTO, Yoshihiro et al., "Construction of a Contiguous 874-kb Sequence of the Escherichia coli-K12 Genome corresponding to 50.5-68.8 min on the Linkage Map and Analysis of Its Sequence Features", DNA Research, April 28, 1997, Volume 4, Number 2, pp.91-113 GenBank Accession No. D90877	21
X	BONNASSIE, S. et al., "Nucleotide sequence of the dapA gene from Corynebacterium glutamicum", Nucleic Acids Research, November 11, 1990, Volume 18, Number 21, page 6421 GenBank Accession No.X53993	21
X	BOUVIER, J. et al., "Nucleotide Sequence and Expression of the Escherichia coli dapB Gene", The Journal of Biological Chemistry, December 10, 1984, Volume 259, Number 23, pp.14829-14834 GenBank Accession No. M10611	23
X	DEKKERS, Linda C. et al., "A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by Pseudomonas fluorescens WCS365", Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, June 9, 1998, Volume 95, Number 12, pp.7051-7056 GenBank Accession No.Y12268	25
A	EP, 37273, A2 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED), 07 October, 1981 (07.10.81) & BR, 8101907, A & DK, 8101404, A & JP, 57-8782, A & ZA, 8102086, A & CA, 1187012, A & IL, 62514, A & DE, 3175828, G & KR, 8701127, B	1-25
A	WO, 96/41871, A1 (Ajinomoto Co., Inc.) 27 December, 1996 (27.12.96) & EP, 834559, A1 & SK, 9701705, A3 & CN, 1203629, A & HU, 9900149, A2 & US, 5989875, A & MX, 9710044, A1	1-25
A	Kerney, P. et al., "Regulation and routes of biosynthesis of serine and arginine in Methylophilus methylotrophus ASI", FEMS Microbiology Letters, July 1987, Volume 42, Nos.2-3, pp. 109- 112	1-25
A	JP, 1-235595, A (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.) 20 September, 1989 (20.09.89) (Family: none)	1-25
A	JP, 53-34987, A (Yoshiki Tani) 31 March, 1978 (31.03.78)	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02295

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The requirement of unity of invention in international application (PCT Rule 13.1) is not satisfied unless there is a technical relationship in a group of inventions involving one or more of the same or corresponding technical features. The term "technical feature" means a technical feature clearly showing the contribution to the prior art by the inventions as set forth in claims as a whole (PCT Rule 13.2). The requirement of unity of invention is judged without considering whether a group of inventions are described in separate claims or in a single claim in an alternative form (PCT Rule 13.3).

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

Inventions as set forth in claims 1 to 25 have a matter in common of a "bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and having an L-amino acid productivity". However, document 1 (Japanese Patent Laid-Open No. 140893/1981) and document 2 (Nature, 287(5781), 396-401 (1980)) describe a bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and carrying *Escherichia coli*-origin glutamate dehydrogenase (GDH) gene transferred in a state of allowing the expression thereof. Furthermore, a process for producing an amino acid by culturing this bacterium is stated in document 1 (see, for example, claim 19 and thereafter). As also stated in the description (p. 13) of the present international application, GDH gene is a gene imparting an L-glutamic acid productivity to a bacterium belonging to the genus *Methylophilus*. Therefore, it can be said that the bacterium belonging to the genus *Methylophilus* as described in document 1 or document 2 is a "bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and having an L-glutamic acid productivity". Accordingly, there had been publicly known a bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and having a productivity of L-glutamic acid, i.e., one of L-amino acids. Thus, the "bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and having an L-amino acid productivity" which is the matter common to inventions as set forth in claims 1 to 25 cannot be regarded as a "special technical feature" as defined in PCT Rule 13.2.

Also, there had been publicly known a dihydrodipicolinate synthase gene (i.e., a gene capable of imparting an L-lysine productivity to a bacterium belonging to the genus *Methylophilus*) originating in a bacterium belonging to the genus *Corynebacterium* (see, for example, document 3 (Nucleic Acids Res., 18(21), 6421 (1990))). Accordingly, the "special technical feature" common to inventions as set forth in claims 16 to 25 is not an "enzyme gene being usable in enhancing the L-lysine productivity of a bacterium belonging to the genus *Methylophilus*" but an "enzyme gene originating in a bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and being usable in enhancing the L-lysine productivity of a bacterium belonging to the genus *Methylophilus*". Thus, it may be said that there is no "special technical feature" as defined in PCT Rule 13.2 between the group of inventions as set forth in claims 1 to 15 relating to a bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and having an L-lysine productivity and the group of inventions as set forth in claims 16 to 25.

Such being the case, the claims involve the following six groups of inventions:

- ① inventions relating to a bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and having an L-lysine productivity as set forth in claims 1 to 15;
- ② inventions relating to a bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and having an L-valine productivity as set forth in claims 1 to 15;
- ③ inventions relating to a bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and having an L-leucine productivity as set forth in claims 1 to 15;
- ④ inventions relating to a bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and having an L-isoleucine productivity as set forth in claims 1 to 15;
- ⑤ inventions relating to a bacterium belonging to the genus *Methylophilus* and having an L-threonine productivity as set forth in claims 1 to 15; and
- ⑥ inventions as set forth in claims 16 to 25.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N1/21, 1/32, 9/00, 15/52, C12P13/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N1/20-1/21, 9/00-9/99, 15/52-15/61,
C12P13/04-13/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 35831, A2 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED) 16.9月.1981 (16.09.81) & NO, 8100773, A & DK, 8100952, A & JP, 56-140893, A & PT, 72630, A & CA, 1187011, A & DE, 3173415, G & RO, 92662, A	1, 4, 11-14
X	WINDASS, J. D. et al., "Improved conversion of methanol to single-cell protein by <i>Methylophilus methylotrophus</i> ", Nature, October 2, 1980, Volume 287, pages 396-401	1, 4, 11-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.07.00

国際調査報告の発送日

18.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SCHENDEL, Frederick J. et al., "Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene Coding for Aspartokinase II from a Thermophilic Methylophilic <i>Bacillus</i> sp.", Applied and Environmental Microbiology, September 1992, Volume 58, Number 9, pages 2806-2814 GenBank Accession No. M93419	17
X	HOANG, Tung T. et al., "Molecular genetic analysis of the region containing the essential <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>asd</i> gene encoding aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase", Microbiology, March 1997, Volume 143, Part 3, pages 899-907 GenBank Accession No. U11055	19
X	YAMAMOTO, Yoshihiro et al., "Construction of a Contiguous 874-kb Sequence of the <i>Escherichia coli</i> -K12 Genome corresponding to 50.5-68.8 min on the Linkage Map and Analysis of Its Sequence Features", DNA Research, April 28, 1997, Volume 4, Number 2, pages 91-113 GenBank Accession No. D90877	21
X	BONNASSIE, S. et al., "Nucleotide sequence of the <i>dapA</i> gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ", Nucleic Acids Research, November 11, 1990, Volume 18, Number 21, page 6421 GenBank Accession No. X53993	21
X	BOUVIER, J. et al., "Nucleotide Sequence and Expression of the <i>Escherichia coli</i> <i>dapB</i> Gene", The Journal of Biological Chemistry, December 10, 1984, Volume 259, Number 23, pages 14829-14834 GenBank Accession No. M10611	23
X	DEKKERS, Linda C. et al., "A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by <i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS365", Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, June 9, 1998, Volume 95, Number 12, pages 7051-7056 GenBank Accession No. Y12268	25
A	EP, 37273, A2 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED) 7.10月.1981 (07.10.81) & BR, 8101907, A & DK, 8101404, A & JP, 57-8782, A & ZA, 8102086, A & CA, 1187012, A & IL, 62514, A & DE, 3175828, G & KR, 8701127, B	1-25

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 96/41871, A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 27.12月.1996 (27.12.96) & EP, 834559, A1 & SK, 9701705, A3 & CN, 1203629, A & HU, 9900149, A2 & US, 5989875, A & MX, 9710044, A1	1-25
A	KEARNEY, P. et al., "Regulation and routes of biosynthesis of serine and arginine in <i>Methylophilus methylotrophus</i> AS1", FEMS Microbiology Letters, July 1987, Volume 42, Numbers 2-3, pages 109-112	1-25
A	JP, 1-235595, A (協和醗酵工業株式会社) 20.9月.1989 (20.09.89), (ファミリーなし)	1-25
A	JP, 53-34987, A (谷吉樹) 31.3月.1978 (31.03.78), (ファミリーなし)	1-25

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件(PCT規則13.1)は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである(PCT規則13.2)。また、発明の単一性の要件の判断は、一群の発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われる(PCT規則13.3)。

そこで、請求の範囲の記載をみると、請求の範囲1-25の発明に共通する事項は「L-

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅱ欄の続き

アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌」である。ところで、文献1「特開昭56-140893号公報」及び文献2「Nature, 287(5781), 396-401(1980)」をみると、そこには、大腸菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)遺伝子を発現し得る状態で導入したメチロフィラス属細菌が記載されており、文献1には更に、この細菌を培養してアミノ酸を製造することについても記載されている(例えば、特許請求の範囲第19項以下参照)。そして、GDH遺伝子は、本国際出願の明細書第13ページにも記載されているように、メチロフィラス属細菌にL-グルタミン酸生産能を付与する遺伝子であるから、文献1又は文献2に記載のメチロフィラス属細菌は「L-グルタミン酸生産能を有するメチロフィラス属細菌」であるといえる。そうすると、L-アミノ酸の一種であるL-グルタミン酸生産能を有するメチロフィラス属細菌は公知であったから、請求の範囲1-25の発明に共通する事項である「L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌」は、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」であるとはいえない。

また、メチロフィラス属細菌にL-リジン生産能を付与し得る遺伝子であるコリネバクテリウム属細菌由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素の遺伝子は、例えば文献3「Nucleic Acids Res., 18(21), 6421 (1990)」にも記載されているように公知であったから、請求の範囲16-25の発明に共通する「特別な技術的特徴」は、「メチロフィラス属細菌のL-リジン生産能を増強するために使用できる酵素遺伝子」ではなく、「メチロフィラス属細菌のL-リジン生産能を増強するのに使用できる、メチロフィラス属細菌由来の酵素遺伝子」である。そうすると、請求の範囲1-15中のL-リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌に関連した発明と、請求の範囲16-25の発明との間には、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

したがって、請求の範囲には、

- ① 請求の範囲1-15中の、L-リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌に関連した発明、
 - ② 請求の範囲1-15中の、L-バリン生産能を有するメチロフィラス属細菌に関連した発明、
 - ③ 請求の範囲1-15中の、L-ロイシン生産能を有するメチロフィラス属細菌に関連した発明、
 - ④ 請求の範囲1-15中の、L-イソロイシン生産能を有するメチロフィラス属細菌に関連した発明、
 - ⑤ 請求の範囲1-15中の、L-スレオニン生産能を有するメチロフィラス属細菌に関連した発明、及び、
 - ⑥ 請求の範囲16-25の発明
- の6発明が包含されている。

